

UNTERSUCHUNGEN ZUR
DESTRUKTION VON
PHYTOCHROM

Christine Guthoff

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0092

UNTERSUCHUNGEN ZUR

DESTRUKTION VON

PHYTOCHROM

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereiches Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Christine Guthoff

aus

Dortmund

1978



1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Rau

Tag der mündlichen Prüfung : 17. März 1978

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich für sein Interesse und stete Diskussionsbereitschaft, die den Fortgang der Arbeit erleichterte.

Herrn G. Rauscher und Herrn H. Schießl danke ich für Entwicklung und präzise Ausführung des Photometers.

Die Arbeit wurde von der DFG durch eine Sachbeihilfe unterstützt. Für finanzielle Unterstützung zum Bau des Photometers sei der Münchener Universitätsgesellschaft gedankt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.) Einleitung	1
2.) Material und Methodik	7
2.1.) Filter und Geräte	7
2.2.) Pflanzenmaterial	7
2.3.) Anzucht und Ernte der Keimlinge	8
2.4.) Herstellung der Phytochromextrakte	8
2.4.1.) Extraktion von löslichem Phytochrom	8
2.4.2.) Extraktion von gebundenem Phytochrom	9
2.5.) Molekulargewichtsbestimmung	10
2.6.) Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	11
2.7.) Versuchsbedingungen der	
2.7.1.) Destruktion in vivo	11
2.7.2.) Untersuchungen zur Stabilität in vitro	12
2.7.3.) Neusynthese nach Destruktion	12
2.8.) Messen in vivo und in vitro	13
2.8.1.) Bestimmung des Phytochromgehaltes	13
2.8.2.) Geräte zur Bestimmung des Phytochromgehaltes	
2.8.2.1.) DMR 22	14
2.8.2.2.) Prinzip des selbstgebauten Photometers	14
2.8.2.3.) Eichung des Photometers	17
2.8.2.4.) Vergleich DMR 22 / Photometer mit Lösungen von Dextranblau bzw. Phytochrom	18
2.8.2.5.) Bestimmung von Phytochrom in Gegenwart von Chlorophyll	18
2.8.2.6.) Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	18
3.) Ergebnisse	19
3.1.) Untersuchung der Meßbedingungen am selbstgebauten Photometer	19
3.1.1.) Vergleich der ΔE -Signale von DMR 22 und Photometer	19

3.1.2.) Bestimmung der Meßbedingungen am Photometer	20
3.1.2.1.) Intensität der Bestrahlungs- lampe	20
3.1.2.2.) Bestimmung der Bestrah- lungszeit	20
3.1.3.) Vergleich Photometer / DMR 22 mit phytochromhaltiger Verdünnungsreihe	21
3.1.4.) Untersuchung von Störfaktoren bei der Bestimmung des Phytochromge- haltes	23
3.1.4.1.) Bestimmung des Phyto- chromgehaltes in vivo (Keimlinge) und in vitro (Extrakt)	23
3.1.4.2.) Bestimmung von Phytochrom in Gegenwart von Chloro- phyll	24
3.2.) Destruktion in vivo	27
3.2.1.) Änderung des Frischgewichtes der Keimlinge bei Dauerbelichtung	27
3.2.2.) Änderung des Phytochromgehaltes bei Dauerbelichtung	28
3.2.3.) Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	31
3.2.4.) Anstieg des Phytochromgehaltes in vivo bei Beginn der Dauerweißlicht- belichtung	33
3.2.5.) Einfluß der Lichtintensität auf die Photoreversibilität bei Beginn der Dauerbelichtung mit Weißlicht	34
3.2.6.) Neusynthese des Phytochroms	36
3.2.7.) Untersuchung der Destruktion in vivo mit Hilfe der Membranbindungsmethode	40
3.7.8.) Molekulargewichtsbestimmung von membrangebundenem Phytochrom vor und nach Destruktion	43

	Seite
4.) Diskussion zur Destruktion in vivo	45
5.) Untersuchungen zur Stabilität von Phytochrom in vitro	53
5.1.) Einleitung und Ergebnisse	53
5.2.) Diskussion	61
6.) Zusammenfassung der Ergebnisse	64
7.) Literaturverzeichnis	67

Abkürzungen

P:	Phytochrom
P _r :	rot- (660 nm-) absorbierende Form von Phytochrom
P _{fr} :	dunkelrot- (730 nm-) absorbierende Form des Phytochroms
P _{total} :	Gesamtes Phytochrom (P _r und P _{fr})
HR:	Hellrotlicht der Wellenlänge 660 nm
DR:	Dunkelrotlicht der Wellenlänge 730 nm
E:	Extinktion
ΔE , $\Delta(\Delta E)$:	siehe Kapitel 2.8.1.
20 KS:	Überstand (supernatant) nach Zentrifugation bei 20 000 g
20 KS':	Überstand (supernatant) nach 2. Zentrifugation bei 20 000 g
RE, AÜ ₂ , ASFÜ ₂	und angereicherte Phytochromlösung: siehe Kapitel 2.4.1.
MOPS:	Morpholinopropansulfonsäure
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1.) Einleitung

Bei der Entwicklung einer Pflanze (Photomorphogenese, MOHR, 1966) kommt dem Einfluß des Lichtes eine zentrale Bedeutung zu. Neben den Pigmenten der Photosynthese gibt es ein Hellrot/Dunkelrot antagonistisch wirkendes Pigment: das Chromoprotein Phytochrom, welches für zahlreiche lichtabhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse verantwortlich ist. Mit den Untersuchungen von BORTHWICK et al. (1952, 1954) konnten Wirkungsspektren aufgestellt werden und es zeigte sich, daß das System photoreversible Eigenschaften aufweist: Samenkeimung konnte durch Bestrahlung mit Rotlicht (um 660 nm) gefördert und durch Bestrahlung mit Dunkelrotlicht (um 730 nm) gehemmt werden. Weitere Untersuchungen des Photoresponses ließen darauf schließen, daß alle Hellrot/Dunkelrot reversiblen Prozesse den gleichen Photorezeptor haben, welcher in zwei, durch Bestrahlung mit unterschiedlichen Wellenlängen ineinander umwandelbaren Formen existieren kann (BORTHWICK et al., 1954). Diese beiden Formen konnten von HENDRICKS et al. (1956) spektral nachgewiesen werden, wobei P_r im hellroten Bereich (660 nm) absorbiert und durch Bestrahlung mit dieser Wellenlänge in P_{fr} übergeht, dessen Absorptionsmaximum etwa bei 730 nm liegt. Durch Bestrahlung mit Dunkelrotlicht kann P_{fr} wieder in P_r umgewandelt werden. Aufgrund von physiologischen Untersuchungen stellte sich heraus, daß P_r die inaktive, P_{fr} jedoch die aktive Form des Pigments darstellt zur Auslösung der Photomorphogenesen (BORTHWICK, HENDRICKS, 1960). Werden etiolierte Pflanzen dem Hellrot- oder Weißlicht ausgesetzt, so findet eine Phototransformation des zuvor in der P_r -Form vorliegenden Phytochroms in die P_{fr} -Form statt. P_{fr} jedoch ist instabiler und unterliegt der Destruktion.

Der Begriff Destruktion veranschaulicht die Beobachtung, daß der Gehalt an spektralphotometrisch nachweisbarem Phytochrom nach Belichtung abnimmt. Es wurde gezeigt, daß die Destruktion von Phytochrom in etiolierten Maiskeimlingen abhängig ist von der Sauerstoffaufnahme des Gewebes und sich hemmen läßt z.B. durch Verringerung der Sauerstoffkonzentration oder Zu-

gabe von Azid (BUTLER, LANE, 1965). Auch stellte sich heraus, daß nur etwa 75-80% des P_r in P_{fr} umgewandelt werden, also ein Photogleichgewicht entsteht, und daß nach Ablauf der Destruktion die restlichen 20% P_r erhalten bleiben (DeLINT, SPRUIT, 1963; PRATT, MARMÉ, 1976). Die Destruktion der P_{fr} -Form des Phytochroms findet sich bei Mono- und Dikotyledonen. Bei Amaranthus zum Beispiel ist sie eine Reaktion 1. Ordnung und bei Dauerbelichtung abhängig vom prozentualen Anteil an P_{fr} bezogen auf den Gesamtphytochromgehalt, also dem Verhältnis: P_{fr}/P_{total} (KENDRICK, FRANKLAND, 1968; KENDRICK, HILLMAN, 1971). LANGE et al. (1971) konnten bei Senf zeigen, daß eine strenge Beziehung besteht zwischen P_{fr} -Destruktionsrate und photomorphogenetischer Wirkung, da z.B. die Syntheseraten für Anthocyan und Lipoxygenase abhängig sind von der Menge an P_{fr} .

Jedoch bei den Monokotylen Mais und Hafer ist die Destruktion bereits bei einem sehr geringen Gehalt an P_{fr} gesättigt (PRATT, BRIGGS, 1966; CHORNEY, GORDON, 1966; DOOSKIN, MANCINELLI, 1968). Versuche mit Hafer brachten immer die gleiche Destruktionsrate bei verschiedenen P_{fr}/P_{total} -Verhältnissen, welche durch unterschiedliche Belichtung mit HR-, Blau- und Weißlicht erreicht wurden (KENDRICK, 1972).

Die in vivo auftretende Destruktion nach Kurzzeit-Belichtung oder bei Dauerbelichtung bedingt, daß in grünen Pflanzen sehr viel weniger Phytochrom enthalten ist als in etiolierten (SIEGELMAN, FIRER, 1964; LANE et al., 1963).

Die beschriebene Destruktion setzt nicht immer sofort bei Beginn der Belichtung ein, sondern oftmals mit Verzögerung: es tritt eine lag-phase auf. Sie wurde bei verschiedenen Pflanzen nachgewiesen, so zum Beispiel bei Erbsen-Keimlingen unter Dauerbelichtung mit Blaulicht (SMITH, ATTRIDGE, 1970), unter Dauerhellrotbelichtung bei Alaska-Erbsen-Keimlingen (McATHUR, BRIGGS, 1971) oder auch nach saturierender HR-Belichtung bei Senf (MARMÉ et al., 1971) und z.B. bei Maiskeimlingen nach 2' HR-Belichtung (BUTLER et al., 1963). Jedoch wurde auch sofort einsetzende Destruktion ohne lag-phase bei Epikotyl-Haken von Erbsen gefunden (CLARKSON, HILLMAN, 1968).

CHORNEY und GORDON (1966) stellten ein Wirkungsspektrum der lichtabhängigen Phytochromdestruktion bei Hafer auf. Es zeigt breite Maxima: einmal zwischen 380 und 440 nm und das andere zwischen 600 und 700 nm, mit einem Peak bei 660 nm. Bei gleichen eingestrahelten Lichtmengen ist der rote Bereich des Spektrums wirkungsvoller als der blaue. Ihre Untersuchungen geben nur einen schwachen Hinweis auf eine lag-phase vor der Destruktion, so daß sie über den Einfluß der Lichtintensität während der lag-phase keine Aussagen machen können.

Neusynthese von Phytochrom wird bei verschiedenen Pflanzen beschrieben. Bei Mais gibt es eine Neusynthese im Dunkeln, die gekoppelt ist mit dem Wachstum der Keimlinge (BUTLER, LANE, 1965). Die Autoren beschreiben nach Belichten der Keimlinge eine geringere Syntheserate während der folgenden Wachstumsphase im Dunkeln. Ebenso wird bei Gerste (BRIGGS, SIEGELMAN, 1965) und Roggen (CORRELL, SHROPSHIRE, 1968) eine Zunahme des Phytochromgehaltes während des Wachstums beschrieben. In Erbsenpflanzen läßt sich eine Neusynthese durch wiederholte Belichtung induzieren (CLARKSON, HILLMAN, 1967 a,b). Bei Gewebekulturen von wilden Möhren wurde gezeigt, daß bei der Neusynthese von Phytochrom in zuvor belichteten Kulturen P_r akkumuliert (WETHERELL, 1969). Auch nach Ablauf der Destruktion wurde Neusynthese nachgewiesen bei Amaranthus (KENDRICK, FRANKLAND, 1969) und bei Kürbis (QUAIL et al., 1973 a). In einer weiteren Arbeit beschreiben die gleichen Autoren auch einen "turn over" von Phytochrom in Kürbiskotyledonen (QUAIL et al., 1973 b).

BOISARD et al. (1974) konnten zeigen, daß bei Kürbis-Keimlingen die Phytochromdestruktion in der membrangebundenen Fraktion abläuft. Membranbindung von Phytochrom tritt auf, wenn etiolierte Keimlinge mit HR oder Weißlicht belichtet werden. Dabei wandert ein Teil des vorher gleichmäßig im Cytoplasma verteilten Phytochroms (COLEMAN, PRATT, 1974 b) in begrenzte Zonen der Zelle. Die Bildung dieser sogenannten "discrete regions" bedeutet möglicherweise eine physiologisch notwendige Bindung des Phytochroms an einen Rezeptor (MACKENZIE et al., 1975). Untersuchungen bei Kürbis zeigten,

daß auch hier nach Belichtung von etiolierten Keimlingen in vivo ein Teil des Phytochroms gebunden wird und zwar an eine Membranfraktion (MARME et al., 1974). Bei Haferkeimlingen wurde schon früher eine Bindung des Phytochroms an pelletierbare Bestandteile der Zelle beschrieben (RUBINSTEIN et al., 1969). Die Autoren konnten zeigen, daß nicht alles vorhandene Phytochrom gebunden wird, sondern daß gleichzeitig auch eine "lösliche" Phytochromfraktion existiert. Sie überprüften die Stabilität jeweils der löslichen und der gebundenen Phytochromfraktion und konnten nachweisen, daß die gebundene Fraktion der Destruktion unterliegt, wogegen die lösliche Fraktion keine Destruktion aufwies. Diese Beobachtung der Destruktion wurde in vitro durchgeführt.

Immunchemische Untersuchungen der Destruktion des Phytochroms in vivo zeigen, daß Destruktion den Verlust an extrahierbarem Phytochromprotein beinhaltet (PRATT et al., 1974; COLEMAN, PRATT, 1974 a). Daraus schließen die Autoren, daß Destruktion ein proteolytischer Abbau des Chromoproteins sein könnte. Proteolytischer Abbau des Phytochroms wurde bereits in Extrakten aus Hafer- und Roggenkeimlingen nachgewiesen, wobei aus einer Phytochromfraktion mit einem Molekulargewicht von 120 000 ("großes" Phytochrom) ein Phytochrom mit einem Molekulargewicht von 62 000 ("kleines" Phytochrom) erhalten und mit SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde. Dabei bilden Endoproteasen von Hafer aus dem "großen" Phytochrom ein "kleines" Phytochrom, und es wurde gezeigt, daß bei längerer Aufarbeitungsdauer der Anteil an "kleinem" Phytochrom steigt (GARDNER et al., 1971; PIKE, BRIGGS, 1972; GROMBEIN, RÜDIGER, 1976).

Die spektralphotometrische Bestimmung des Phytochroms wird erschwert, wenn zum Beispiel der Phytochromgehalt in den Keimlingen direkt bestimmt oder trübe und stark streuende Lösungen untersucht werden sollen.

In trüben Lösungen entspricht der Lichtweg des Meßstrahls nicht der Probenstärke, sondern Reflexion und Streuung der Partikel bewirken eine Vergrößerung des Lichtweges. Damit ist

gleichzeitig eine Verstärkung der Absorptionsbanden von Pigmenten im lichtstreuenden Medium verbunden (BUTLER, 1962). Dieser Effekt wird benutzt, um z.B. mit Hilfe der CaCO_3 -Technik die Extinktion von stark streuenden und sehr verdünnten Lösungen zu bestimmen (BUTLER, NORRIS, 1960). Auch ist in vivo eine Beeinflussung durch Pigmente nicht auszuschließen, die stärker absorbieren als das zu untersuchende Phytochrom (SPRUIT, 1972). So kann die Absorption von Rotlicht durch Chlorophyll die Phototransformation von Phytochrom in die P_{fr} -Form beeinträchtigen (RÜDIGER, 1972).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Photometer fertiggestellt, welches nach den Angaben von MARMÉ (1969 b) in modifizierter Form nachgebaut wurde. Mit diesem Gerät war es uns zum ersten Mal möglich, den Phytochromgehalt in stark streuenden Lösungen oder in den Keimlingen direkt zu bestimmen. Es war jedoch zunächst erforderlich, einen Vergleich mit dem sonst zu Phytochrommessungen herangezogenen DMR 22 aufzustellen. Damit sollte sichergestellt sein, daß mit dem selbstgebauten Photometer vergleichbare Ergebnisse wie mit dem zuvor verwendeten DMR 22 erzielt werden.

Die Untersuchungen der Destruktion in vivo zeigen ein uneinheitliches Bild, und über das Vorhandensein der lag-phase existieren widersprüchliche Daten (DOOSKIN, MANCINELLI, 1968; KIDD, PRATT, 1973). Daher wurde in dieser Arbeit die lichtinduzierte Destruktion in vivo bei Haferkeimlingen erneut untersucht. Berücksichtigt wurde dabei der Einfluß des Keimlingsalters auf die Destruktion, da dies bisher noch nicht ausreichend untersucht wurde. MARMÉ et al. (1971) fanden bei Senf eine steigende Destruktionsrate mit zunehmendem Alter, wogegen KIDD und PRATT (1973) bei Hafer eine umgekehrte Altersabhängigkeit feststellten, da mit zunehmendem Alter die Destruktionsrate abnahm. Da CHORNEY und GORDON (1966) bei ihrer Untersuchung des Wirkungsspektrums der lichtabhängigen Phytochromdestruktion nur einen Hinweis auf eine möglicherweise vorhandene lag-phase fanden, haben wir auch diese Frage in unsere Untersuchungen miteinbezogen und die Abhängigkeit der Destruktion in vivo im Hinblick auf die Intensitäts-

abhängigkeit überprüft. Weitere Aspekte dieser Arbeit waren die Fragen, ob bei der Destruktion in vivo die pelletierbare und/oder die lösliche Fraktion abgebaut werden; ob mit Hilfe der Membranbindungsmethode ein proteolytischer Abbau nachweisbar ist und in welcher Weise sich das Molekulargewicht des gebundenen Phytochroms ändert, wenn Destruktion in vivo bei Dauerweißlicht stattfindet. Auch wurde die Neusynthese des Phytochroms untersucht, welche bei Hafer noch nicht beschrieben wurde.

Ein Teil dieser Untersuchungen wurde erst durch das selbstgebaute Photometer ermöglicht, denn nun konnte der Phytochromgehalt in den Keimlingen direkt und schnell bestimmt werden.

2.) Material und Methodik

2.1.) Filter und Geräte

Sämtliche Arbeiten wurden unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt. Damit wurde eine Umwandlung der P_r -Form in die wesentlich instabilere P_{fr} -Form vermieden (BUTLER et al., 1964; MUMFORD, 1966).

Das erforderliche grüne Sicherheitslicht wurde gewonnen mit Hilfe von Plexiglasfiltern in der Anordnung grün - orange - grün der Firma Röhm und Haas GmbH, Darmstadt, Nr. 701 grün, Nr. 478 orange, die das von Leuchtstoffröhren (Philips TL 40w/17) emittierte Licht filterten (BRAUNER, RAU, 1966).

Das Hellrotlicht zur Bestrahlung der Keimlinge in vivo wurde erreicht durch ein rotes Plexiglasfilter der Fa. Röhm und Haas, Nr. 501, und als Beleuchtungsquelle dienten Leuchtstoffröhren, Philips TL 15w/34. Ebenso wurde das Dunkelrotlicht erzeugt, jedoch mit Plexiglasfiltern in der Anordnung: blau - rot - blau, Nr. 501 rot, Nr. 627 blau. Der Abstand zwischen Bestrahlungseinrichtung und Keimlingen betrug 15 cm.

Für die Weißlichtbestrahlung wurde eine Anordnung von 4 Leuchtstoffröhren (Osram-L 20w/30 Warmton) herangezogen, die in der Höhe verstellbar war, so daß verschiedene Lichtintensitäten (Lux) auf der Ebene der belichteten Keimlinge eingestellt werden konnten.

Zum Zentrifugieren der Extrakte wurde eine Kühlzentrifuge G 50 K der Firma WKF, Brandau verwendet.

2.2.) Pflanzenmaterial

Als Material zur Untersuchung der Phytochromdestruktion diente folgendes Saatgut: Hafer (*Avena sativa*, L., Sorte Delphin, gebeizt), Sommergerste (*Hordeum vulgare*, L.), Sommerweizen (*Triticum aestivum*, L., Kolibri), Hirse (*Sorghum spec.*, Sorte Silberhirse) und Senf (*Sinapis alba*, L., Sorte Steinnacher Weiß) und wurde von den Firmen BayWa, München, Bayerische Futter- und Saatbau-Vereinigung GmbH München, bzw. Dehner und Co., München bezogen. Außerdem wurde Senfsamen

von der Firma Becker, Heilbronn verwendet, den Herr Dr. MARMÉ, Freiburg, uns freundlicherweise zur Verfügung stellte.

2.3.) Anzucht und Ernte der Keimlinge

Kunststoffschalen von der Größe 50 x 60 cm wurden gefüllt mit 3 Liter Vermiculith, Körnung Nr. 4, und dies mit 2 Liter Leitungswasser befeuchtet. Auf diese Schicht wurden nun 200 g Haferkörner gleichmäßig ausgesät und mit einer Plastiklochplatte bedeckt, deren Löcher 3 mm im Durchmesser aufwiesen.

Die Anzucht erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 27-28°C bei maximaler Luftfeuchtigkeit und nach 3, 4 oder 5 Tagen konnten die Keimlinge im grünen Sicherheitslicht geerntet werden. Die Lochplatte erleichterte das Ernten der Keimlinge, denn diese brauchten nur noch mit einem Spachtel abgeschnitten zu werden. Die geernteten Keimlinge kamen entweder zur Aufbewahrung in einen Gefrierschrank bei -20°C oder wurden sofort weiterverarbeitet.

Gerste, Weizen, Hirse und Senf wurden ebenso angezogen, jedoch die Senfsamen nicht mit einer Lochplatte abgedeckt. Die Senfkeimlinge wurden einzeln geerntet und mit einer Rasierklinge in Hypokotyl und Kotyledonen getrennt, in welchen jeweils der Phytochromgehalt direkt bestimmt wurde.

2.4.) Herstellung der Phytochromextrakte

2.4.1.) Extraktion von löslichem Phytochrom

Nach der Vorschrift von GROMBEIN (1976) wurden 4 Tage alte, frische, etioliierte Keimlinge (1000 g) mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,1 in einem Mixer zerkleinert (waring blender), wobei das Verhältnis Keimlinge : Puffer = 2:1 (w:v) betrug. Dieser Brei wurde durch ein Tuch gepreßt. Der abgepreßte Saft ist das sog. Homogenat.

Der Überstand der Zentrifugation (30', 38 000 g) vom Homogenat ist der Rohextrakt (RE, 1200 ml, $\Delta(\Delta\epsilon)$: 0,011). Dieser Zentrifugationsschritt wird jedoch ausgelassen, wenn eine weitere Reinigung und Anreicherung des Phytochroms erfolgen

soll. Dazu wird mit dem Homogenat eine Adsorption an Hydroxylapatit bei pH 6,2 durchgeführt. Der verwendete Hydroxylapatit $[\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3]$ ist erhältlich als trockenes Pulver unter dem Namen "Tricalciummonophosphat" in DAB₆-Qualität von der Firma Benckiser-Knapsack, Ladenburg, Neckar. Zur Durchführung der Adsorption wurde trockener Hydroxylapatit (8 g/100 ml) in den abgepreßten Saft eingerührt und anschließend noch 30 Minuten weitergerührt bei Kontrolle des pH-Wertes. Der Hydroxylapatit mit dem gebundenen Protein wurde abzentrifugiert (15', 10 000 g) und der erhaltene Niederschlag resuspendiert mit 0,3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0. Die verwendete Menge Puffer zum Resuspendieren betrug 1/5 des Volumens des bei der Zentrifugation erhaltenen Überstandes. Die Desorption erfolgte bei pH 7,8 und nach 30 Minuten wurde erneut zentrifugiert (30', 15 000 g). Der Hauptanteil des Phytochroms befand sich nun im Überstand, AÜ₂ genannt (250 ml, $\Delta(\Delta E)$: 0,0375). Als nächster Anreicherungs-schritt erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung mit 40% Sättigung. Dazu wurde im Verlauf von 30 Minuten trockenes, zerriebenes Ammoniumsulfat (25 g/100 ml AÜ₂) in das AÜ₂ eingerührt und anschließend noch weitere 30 Minuten stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren (30', 35 000 g) des Niederschlages wurde dieser in 0,02 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,8 resuspendiert, wobei die Menge des verwendeten Puffers 1/5 des Volumens von AÜ₂ betrug. Nach 30 Minuten Rühren wurde erneut zentrifugiert (30', 35 000 g). Der erhaltene Überstand (2. Überstand der Ammoniumsulfatfällung, ASFÜ₂ genannt, 50 ml, $\Delta(\Delta E)$: 0,150) enthielt angereichertes Phytochrom.

Die Aufarbeitung erfolgte bei grünem Sicherheitslicht und die Phytochromlösung wurde bei jedem Schritt stets auf 4°C gehalten.

Die Puffer enthielten unterschiedliche Konzentrationen an Na_2SO_3 . Dies ist bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Wenn belichtete Proben verwendet wurden, so erfolgte die Belichtung stets in vivo.

2.4.2.) Extraktion von gebundenem Phytochrom

Als Extraktionspuffer wurde ein 25 mM MOPS-Puffer, pH 7,5

verwendet (GROMBEIN et al., 1975). Dazu wurde bei einer 25 mM MOPS-Lösung der pH eingestellt mit einer 25 mM Tris-Lösung. Beide Lösungen enthielten je 0,01 M Na_2SO_3 . Die erforderliche Menge Puffer betrug - bezogen auf das Keimlingsgewicht - w:v = 1:1. Zur Extraktion wurde dem Puffer so viel Mg^{2+} -Lösung zugesetzt, daß eine Konzentration von 20 mM Mg^{2+} erreicht wurde. Nach Mixen und Abpressen wurde der pH des Extraktes auf 6,8 eingestellt und 30 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand (20 KS) enthielt die lösliche Phytochromfraktion, wogegen sich der gebundene Anteil im Niederschlag befand. Hier wurde das Phytochrom nun herausgelöst mit MOPS-Puffer, jedoch ohne den Zusatz von Mg^{2+} und es wurde die gleiche Menge Puffer verwendet wie bei der Extraktion. Nach 30 Minuten Resuspendieren im Eis wurde erneut 30 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand (20 KS') enthielt nun das vorher gebundene Phytochrom. Gemessen wurden die Proben am DMR 22.

2.5.) Molekulargewichtsbestimmung

Die verwendeten Keimlinge waren 4 Tage alt. Ein Teil der etiolierten Keimlinge wurde mit 8' HR in vivo belichtet und anschließend unter grünem Sicherheitslicht der Anteil an gebundenem Phytochrom extrahiert. Ein weiterer Teil der Aussaat wurde zunächst im Dunkeln gekeimt und erhielt dann 32 Stunden Dauerweißlicht, so daß die Keimlinge danach genau 4 Tage alt waren und ebenfalls unter grünem Sicherheitslicht aufgearbeitet werden konnten.

Aus jeweils 200 g Keimlingen wurde nach den Vorschriften der Membranbindung das Phytochrom der gebundenen Fraktion extrahiert (GROMBEIN et al., 1975). Zur Desorption kamen jedoch nur 20 ml MOPS-Puffer zur Anwendung, da so der $\Delta(\Delta E)$ -Wert der Lösung höher war. Die Molekulargewichtsbestimmung wurde durchgeführt mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G-200 (Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden). Die verwendete Säule hatte die Maße: 2,5 x 50 cm; der Elutionspuffer setzte sich zusammen aus: 0,01 M Tris-HCl; 0,01 M Na_2SO_3 ; 0,001 M NaN_3 ; pH 7,8. Der Durchfluß betrug: 2 ml/h bzw. wurde aufgefangen:

2 ml/Fraktion. Die Säule wurde geeicht mit Dextranblau (MG 2 000 000, scheinbares MG 800 000), Katalase (MG 240 000), Rinderserumalbumin (MG 67 000) und Cytochrom c (MG 12 500). Von den Lösungen des membrangebundenen Phytochroms wurden je 2 ml Probe aufgetragen.

2.6.) Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Mit einer Warburgapparatur wurde der Sauerstoffverbrauch bei verschieden alten Keimlingen bestimmt.

In den Hauptraum des Warburg-Gefäßes wurden 3, 4 und 5 Tage alte Keimlinge möglichst unverletzt gebracht und 0,5 ml dest. Wasser hinzugefügt, um so ein Austrocknen der Keimlinge zu verhindern. Der mittlere Einsatz enthielt 0,2 ml 10% KOH und Filterpapier. Damit wurde das bei der Atmung entstandene CO₂ aufgefangen. Das umgebende Wasserbad blieb konstant auf 25°C. Die Zeit zum Füllen der Gefäße bis zum Versuchsbeginn betrug ca. 1 Stunde. Ein Teil der Versuche wurde im Dunkeln, d.h. grünes Sicherheitslicht, und ein Teil im Dauerweißlicht durchgeführt. Das Ablesen der Druckdifferenz erfolgte alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 4 Stunden.

2.7.) Versuchsbedingungen der

2.7.1.) Destruktion in vivo

3, 4 und 5 Tage alte Haferkeimlinge wurden in vivo mit Dauerweißlicht der verschiedenen Lichtintensitäten von 200-3000 Lux bestrahlt und im Verlauf von 3,5 Stunden der Gehalt an Phytochrom jeweils durch Extraktion (RE) und Messen am DMR 22 bestimmt.

Eine weitere Versuchsreihe wurde durch das selbstgebaute Photometer ermöglicht, denn nun konnte der Phytochromgehalt in den Keimlingen direkt bestimmt werden. Hier wurde eine Lichtintensität von 2000 Lux gewählt und im Verlauf von 3,5 Stunden der Gehalt an Phytochrom bestimmt. Gemessen wurden jeweils 5 Keimlinge/Küvette.

Auch die Methode zur Isolierung von gebundenem Phytochrom wurde angewandt zur Untersuchung der Destruktion in vivo. 4 Tage alte, etioliierte Haferkeimlinge wurden dem Dauerweißlicht (2000 Lux) ausgesetzt oder erhielten 8' HR in vivo und wurden dann zurück ins Dunkel gestellt. Im Verlauf der Destruktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils der Gehalt an löslichem und pelletierbarem Phytochrom bestimmt.

2.7.2.) Untersuchungen zur Stabilität in vitro

Bei diesen Untersuchungen in vitro wurden folgende Proben benötigt: Homogenat, Rohextrakt, Al_2O_3 , AsF_5 und Pellet. Diese Proben wurden hergestellt wie oben beschrieben, die erforderlichen Belichtungen in vivo durchgeführt, nach Bedarf der Gehalt an Na_2SO_3 im Puffer variiert und die Proben zum Teil als Schutz vor Luftsauerstoff mit Paraffin überschichtet (wie jeweils angegeben). Bei einigen Versuchen wurde ein sog. "Pellet" benötigt. Dieses ist der Niederschlag der Homogenatzentrifugation (30', 38 000 g), bei welcher als Überstand der Rohextrakt (RE) erhalten wird. Die dazu verwendeten Keimlinge waren 4 Tage alt und erhielten vor der Extraktion 2 h Dauerweißlicht von 2000 Lux. Die Bestimmung des Phytochromgehaltes erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten am DMR 22.

2.7.3.) Neusynthese nach Destruktion

In 4 Tage alten Haferkeimlingen wurde stündlich der Gehalt an Phytochrom bestimmt, indem einmal die Keimlinge direkt im selbstgebauten Photometer gemessen wurden (5 Stück/Küvette) oder mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,1, der 0,01 M Na_2SO_3 enthält, ein Homogenat hergestellt und auch dieses im selbstgebauten Photometer gemessen wurde. Die Meßwerte ermitteln sich aus jeweils 5 Bestimmungen.

Die etioliierten Keimlinge erhielten folgende Belichtungen:

5 Minuten HR, anschließend Dunkel

15 Minuten HR, anschließend Dunkel

Dauerweißlicht bis zu 1,5 Stunden, anschließend zum Teil 15 Minuten DR, dann Dunkel

Dauerhellrot bis zu 1,5 Stunden, auch hier anschließend zum Teil 15 Minuten DR, dann Dunkel.

Weitere Versuche wurden durchgeführt mit Sommergerste, Sommerweizen und Hirse.

Hier erhielten jeweils 4 Tage alte Keimlinge 1,5 Stunden Hellrotlicht und wurden dann zurück in den Brutschrank, also dunkel gestellt. Vor und nach Belichtung und in der Dunkelphase alle 2 Stunden wurde der Phytochromgehalt am selbstgebauten Photometer bis zu 8 Stunden Dunkelphase und dann nach 24 Stunden wieder bestimmt.

Auch wurde in den von uns durchgeführten Versuchen Senf der Bayerischen Futter- und Saatbau-Vereinigung GmbH München (Sorte Steinacher Weiß) und ein Senf der Firma Becker, Heilbronn verwendet, den Herr MARMÉ (1969 a) uns freundlicherweise zur Verfügung stellte. Der Versuch wurde durchgeführt zu den von MARMÉ beschriebenen Bedingungen.

Die 36 Stunden alten Senfkeimlinge erhielten 1,5 Stunden HR, anschließend 15' DR-Bestrahlung und wurden dann wieder dunkel gestellt. Die Bestimmung des Phytochromgehaltes erfolgte am selbstgebauten Photometer vor und nach der Belichtung und nach 2 bzw. 4 Stunden Dunkelphase. Jeweils 20 Keimlinge/Küvette wurden aufgeteilt in Kotyledonen und Hypocotyl und diese getrennt gemessen. Die angegebenen Werte ermitteln sich aus jeweils 9 Messungen.

2.8.) Messen in vivo und in vitro

2.8.1.) Bestimmung des Phytochromgehaltes

Die Bestimmung des Phytochromgehaltes beruht auf der Eigenschaft des Moleküls, zwei ineinander umwandelbare Formen (P_r bzw. P_{fr}) zu bilden (BUTLER et al., 1959; BUTLER et al., 1963).

Der Gehalt errechnet sich aus den Extinktionsdifferenzen der P_r - und der P_{fr} -Form des Phytochroms. Beide haben Maxima bei 660 nm und 730 nm, die sich jeweils in ihrer Größe unterscheiden. Man bildet die Differenz bei der P_r -Form: $E_{660} - E_{730}$, und das gleiche bei der P_{fr} -Form. So erhält man ΔE_{660}

und ΔE_{730} und aus der Differenz von $\Delta E_{730} - \Delta E_{660}$ ergibt sich die Maßeinheit für den Gehalt an Phytochrom, sog. $\Delta (\Delta E)$.

2.8.2.) Geräte zur Bestimmung des Phytochromgehaltes

2.8.2.1.) DMR 22

Als Photometer wurde zunächst das zweistrahlige Spektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator der Firma Zeiss verwendet. Eine hier im Botanischen Institut entwickelte und gebaute Beleuchtungseinrichtung ermöglichte es, die Proben im Küvettenraum mit HR- bzw. DR-Licht zu bestrahlen (GROMBEIN, 1976). Dazu wurden Bauteile eines Projektors (Leitz, Wetzlar, Typ Prado, 12 V Halogenlampe) und Interferenzfilter der Firma Seavom, Argenteuil, F. verwendet, und zwar:

für HR: 660,3 nm

HW = 12,8 nm

$T_{\max}$ = 78%

für DR: 728,3 nm

HW = 14 nm

$T_{\max}$ = 75%

Die Messungen wurden stets bei 4°C durchgeführt.

Eine Erleichterung bei der Bestimmung des Phytochromgehaltes brachte ein hier im Institut gebautes Photometer. Ein solches Gerät wurde entwickelt und gebaut im Biologischen Institut II der Universität Freiburg (MARMÉ, 1969 b) und hier in etwas modifizierter Form nachgebaut. Dieses Gerät ermöglicht es uns zum ersten Mal, den Phytochromgehalt in Keimlingen direkt zu bestimmen.

2.8.2.2.) Prinzip des selbstgebautes Photometers

Der Meßstrahl wird durch einen halbdurchlässigen Spiegel aufgeteilt in zwei Strahlen, wobei ein Strahl auf ein Interferenzfilter mit 660 nm und der andere Strahl auf ein Interferenzfilter mit 730 nm trifft. Im Anschluß an die Filter ist ein Blendenrad angeordnet, so daß abwechselnd Licht der Wellenlänge 660 nm oder 730 nm durchgelassen wird. Mit Hilfe eines weiteren halbdurchlässiger Spiegels werden die Meßstrahlen auf eine Ebene projiziert. Die nun folgende Küvette befindet sich direkt vor dem Photomultiplier. Damit werden

Meßfehler ausgeschlossen, die durch eine starke Streuung der Proben und einem damit verbundenen Abschwächen des Signals bei größerem Abstand vom Photomultiplier bedingt sind.

Der Ausgangsstrom des Photomultipliers ist ein Wechselstrom, welcher alternierend den Transmissionswert bei 660 nm und 730 nm angibt. Eine optische Lichtschrankenordnung am Blendenrad ermöglicht es, diese beiden Werte alternierend darzustellen und zwar mit Hilfe eines Spannungs-Stromwandlers in Form von Gleichspannungen. Aus diesen beiden Spannungen bildet ein logarithmischer Verstärker den Logarithmus aus dem Quotienten $\frac{U_{660}}{U_{730}}$.

Dieser Wert entspricht dem gesuchten ΔE der P_r - oder P_{fr} -Form des Phytochroms. So müssen nun nicht mehr die jeweiligen Extinktionen abgelesen werden, sondern der Phytochromgehalt läßt sich durch nur noch eine Berechnung ($\Delta E_{730} - \Delta E_{660}$) ermitteln.

Eine im Anschluß an das Blendenrad angeordnete Beleuchtungseinrichtung ermöglicht es, die Küvette mit Licht der Wellenlänge 660 nm oder 730 nm über einen wählbaren Zeitraum zu bestrahlen und so P_r oder P_{fr} zu messen, ohne die Küvette aus dem Meßgerät herausnehmen zu müssen.

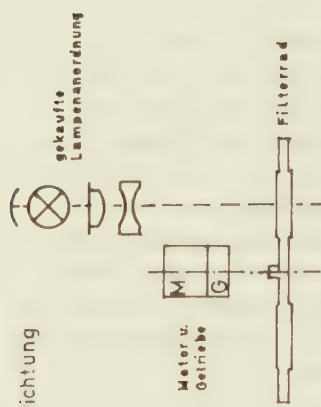
Die Küvette selbst hat 0,3 cm Lichtweg und besteht aus Aluminium mit Glasfenstern. Das Material Aluminium gewährleistet einen relativ schnellen Temperatúrausgleich und verhält sich indifferent gegenüber Phytochrom (LISANSKY, GALSTON, 1974). Zum Messen von klaren Lösungen lassen sich jedoch auch "normale" Glasküvetten mit 1 cm Lichtweg verwenden.

Die Halterung der Küvette ist verbunden mit einem Thermostaten, so daß der Meßvorgang immer bei einer gewünschten Temperatur, hier 4°C, stattfinden kann.

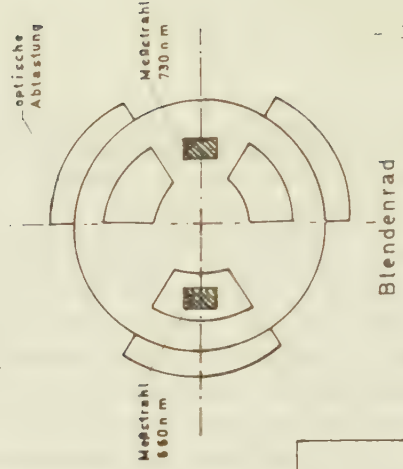
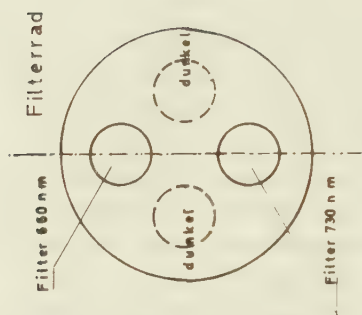
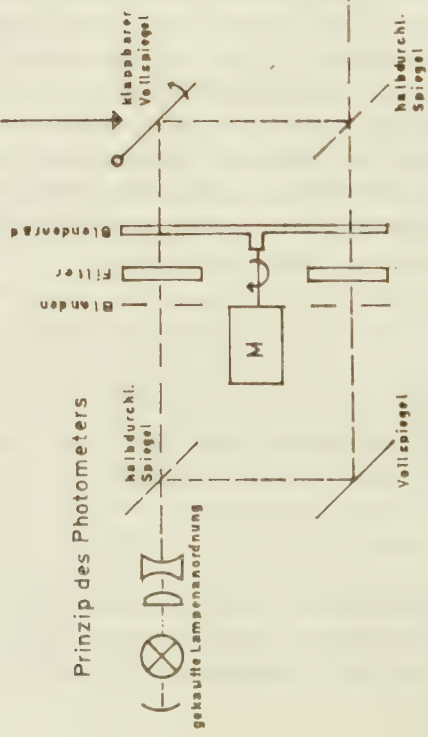
Meßlampe: bellaphot, Osram, 12V/50W, die Lampenanordnung wurde einem Projektor, Leitz, Wetzlar, Typ Prado, entnommen.

Abb. 1: Schematische Darstellung des selbstgebauten Photometers zur schnellen Bestimmung des Phytochromgehaltes in Extrakten und Keimlingen.

Beleuchtungseinrichtung



Prinzip des Photometers



$$\Delta E = \log \frac{U_{660}}{U_{730}}$$

Meßstrahlfilter	: 658,6 nm	730,5 nm
	HW = 4,9 nm	HW = 5,0 nm
	$T_{\max} = 69\%$	$T_{\max} = 73\%$

Beleuchtungsfilter	: 661,1 nm	729,0 nm
	HW = 12,8 nm	HW = 14,0 nm
	$T_{\max} = 77\%$	$T_{\max} = 69\%$

Sämtliche Filter sind von der Firma SEAVOM/France, vom Typ: MDE-DDO-VIS.

Auch die Lampenanordnung der Beleuchtungseinrichtung wurde einem Projektor entnommen, die Lampe selbst ist eine bella-phot, Osram, 24V/250W bzw. 24V/150W.

2.8.2.3.) Eichung des Photometers

Zur Einstellung und Eichung des Gerätes diente eine Dextranblau-Lösung in Wasser, von der jeweils eine konzentrierte und eine verdünnte Lösung hergestellt wurden. Aus diesen Extinktionsdifferenzen ließ sich ein ΔE berechnen. Vergleichsmessungen wurden durchgeführt am Spektralphotometer DMR 22, welches sonst zu Phytochrommessungen herangezogen wurde. Zunächst wurde die Abhängigkeit von Signal - Hochspannung - Spaltbreite untersucht, so daß durch Variieren von Hochspannung oder Spaltbreite die bestmöglichen Meßbedingungen ermittelt werden konnten.

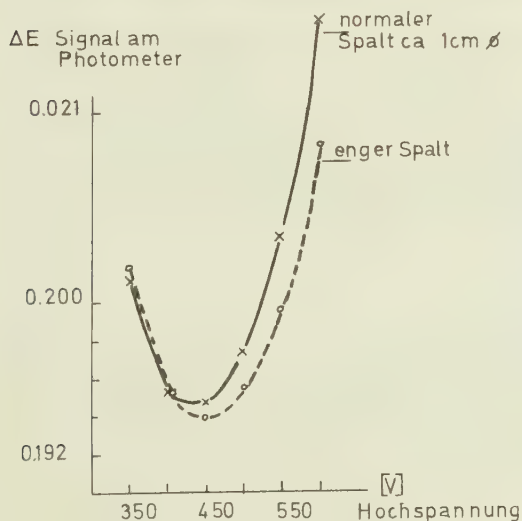


Abb. 2: Bestimmung der Abhängigkeit von Signal - Hochspannung - Spaltbreite; gemessen wurden Dextranblaulösungen unterschiedlicher Konzentrationen.

2.8.2.4.) Vergleich: DMR 22 / Photometer mit Lösungen von Dextranblau bzw. Phytochrom

Bei einer Hochspannung von 450 V und einer Spaltbreite von ca. 1 cm Durchmesser wurde nun eine Verdünnungsreihe von Dextranblaulösung am neuen Photometer gemessen und eine Vergleichsmessung am DMR 22 durchgeführt.

Ausgehend von einer konzentrierten, aufgereinigten Phytochromlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt durch Zugabe von Puffer und die so erhaltenen Proben jeweils am DMR 22 bzw. am selbstgebaute Photometer gemessen.

2.8.2.5.) Bestimmung von Phytochrom in Gegenwart von Chlorophyll

Eine konzentrierte Phytochromlösung aus etiolierten Keimlingen (ASFÜ₂) wurde mit steigenden Mengen eines Rohextraktes aus grünen Keimlingen, welche für 12 Stunden Dauerweißlicht erhalten haben, versetzt. Zum Vergleich wurde an Stelle des Rohextraktes Puffer verwendet. Diese beiden Verdünnungsreihen wurden nun jeweils am DMR 22 und am selbstgebaute Photometer gemessen.

2.8.2.6.) Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes im Rohextrakt aus grünen Keimlingen und in den verschiedenen Stufen der Verdünnungsreihe wurden die Proben mit Äther ausgeschüttelt, der Äther über Na₂SO₄ getrocknet und nach Messen der Extinktionen bei 662 bzw. 644 nm der Chlorophyllgehalt nach der Formel von ZIEGLER und EGLE (1965) bestimmt.

3.) Ergebnisse

3.1.) Untersuchung der Meßbedingungen am selbstgebauten Photometer

3.1.1.) Vergleich der ΔE -Signale von DMR 22 und Photometer

Vergleichende Messungen von Dextranblaulösungen unterschiedlicher Konzentrationen zeigen, daß eine lineare Beziehung besteht zwischen den gemessenen Signalen am Photometer und den Signalen am DMR 22. Die Meßwerte liegen beim Photometer um etwa 3% höher als beim DMR 22.

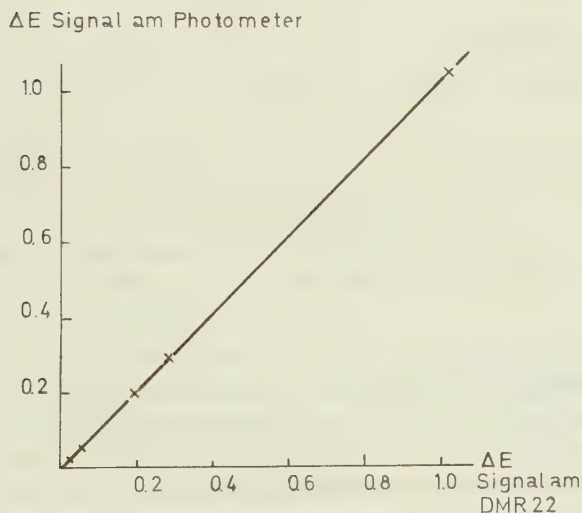


Abb. 3: Vergleich der ermittelten ΔE -Signale von DMR 22 und Photometer; es wurden Dextranblaulösungen unterschiedlicher Konzentrationen gemessen.

3.1.2.) Bestimmung der Meßbedingungen am Photometer

3.1.2.1.) Intensität der Bestrahlungslampe

Als nächstes erfolgte die Bestimmung der Meßbedingungen am Photometer, da eine genaue Messung des Phytochromgehaltes eine vollständige Umwandlung von P_r in P_{fr} und umgekehrt voraussetzt.

So wurde die Abhängigkeit des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes einer Phytochromlösung von der Intensität der Bestrahlungslampe (aktinisches Licht) untersucht.

Tabelle 1: Abhängigkeit des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes von der Intensität der Bestrahlungslampe (aktinisches Licht); die Bestrahlungsdauer beträgt für HR: 15 Sekunden und für DR: 30 Sekunden; die Streuung der Meßwerte beträgt 1,3% im Mittel.

Bestrahlungslampe	250 W	150 W	150 W + Filter
$\Delta(\Delta E)$	$2,15 \cdot 10^{-2}$	$2,11 \cdot 10^{-2}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$

Die Verwendung einer schwächeren Bestrahlungslampe (150 W statt 250 W) bringt nur eine geringe Abschwächung des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes. Setzt man zusätzlich in den Lichtweg der Bestrahlungs-
lampe ein Graufilter mit der Extinktion $E = 2,0$ ein, so bewirkt dies eine deutliche Abnahme des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes (unvollständige Phototransformation).

3.1.2.2.) Bestimmung der Bestrahlungszeit

Bei der Bestimmung der zur vollständigen Phototransformation von Phytochrom notwendigen Bestrahlungszeiten wurde eine 250 W-Lampe verwendet, damit die Bestrahlungszeit möglichst kurz ge-

halten werden konnte.

Tabelle 2: Abhängigkeit des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes von der Bestrahlungsdauer; verwendet wurde eine Bestrahlungs-
lampe mit 250 W; die
Streuung des Mittelwertes betrug 1%.

Bestrahlungsdauer	$\Delta(\Delta E)$
30'' HR 1' DR	0,1520
1' HR 1' DR	0,1514
1' HR 2' DR	0,1630

Bei Untersuchungen von Phytochromlösungen, deren $\Delta(\Delta E)$ -Wert $> 0,1$ ist, sollten die Bestrahlungszeiten 1' HR bzw. 2' DR betragen; bei Lösungen mit einem geringeren Phytochromgehalt (vgl. Tab. 1) sind Bestrahlungszeiten von 15'' HR und 30'' DR ausreichend.

3.1.3.) Vergleich Photometer / DMR 22 mit phytochromhaltiger Verdünnungsreihe

Zu den oben ermittelten Bestrahlungsbedingungen (30'' HR / 1' DR, 250 W) wurden Phytochromlösungen unterschiedlicher Konzentrationen gemessen und eine Vergleichsmessung am DMR 22 durchgeführt. Das Ergebnis ist in folgender Abbildung dargestellt.

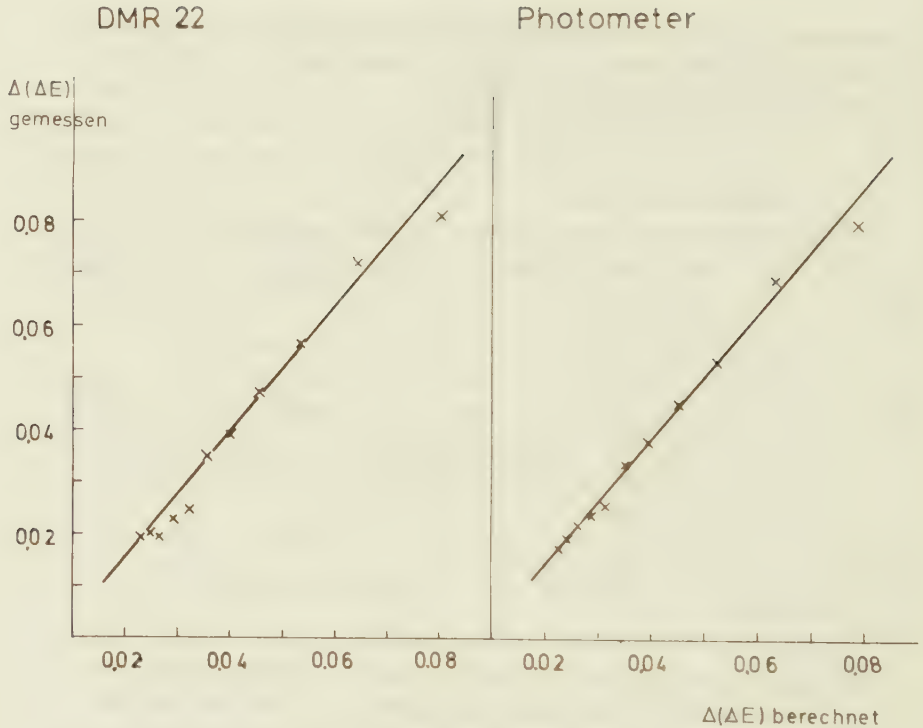


Abb. 4: Vergleich DMR 22 / Photometer; aufgetragen wurden die gemessenen $\Delta(\Delta E)$ -Werte einer phytochromhaltigen Verdünnungsreihe gegen die aus der Verdünnung berechneten $\Delta(\Delta E)$ -Werte.

Auch hier läßt sich eine gute Übereinstimmung der Meßgeräte nachweisen. Die Abnahme des Phytochromgehaltes zeigt bei beiden Geräten den gleichen Verlauf; die erhaltenen $\Delta(\Delta E)$ -Werte sind nicht signifikant unterscheidbar. Entsprechend dem DMR 22 sind mit dem selbstgebaute Photometer eindeutige $\Delta(\Delta E)$ -Messungen bis zu einem $\Delta(\Delta E) = 0,001$ möglich.

Messungen von Proben mit einem geringeren $\Delta(\Delta E)$ -Wert lassen keine genauen Aussagen mehr zu, da dann der Meßwert durch Rauschen des Gerätes überlagert wird.

Der statistische Meßfehler des selbstgebauten Photometers betrug im Mittel bei Lösungen von Phytochrom 4% und bei Keimlingen 7% (5 Keimlinge / Küvette).

3.1.4.) Untersuchung von Störfaktoren bei der Bestimmung des Phytochromgehaltes

3.1.4.1.) Bestimmung des Phytochromgehaltes in vivo (Keimlinge) und in vitro (Extrakt)

Da mit Hilfe des selbstgebauten Photometers der Phytochromgehalt auch in den Keimlingen direkt bestimmt werden kann, sollte nun geklärt werden, ob eine zuverlässige, reproduzierbare Messung in intaktem Gewebe möglich ist.

Hierzu wurde der Gehalt an Phytochrom am selbstgebauten Photometer bestimmt, einmal direkt in den Keimlingen oder - nach Extraktion mit Puffer und Entfernen der groben Zellbestandteile - im Homogenat. Für eine definierte Konzentrationsreihe von Phytochrom wurden die Keimlinge und das Homogenat unter Bedingungen der Destruktion in vivo (vgl. Abschnitt 2.7.1.) gemessen. Der Phytochromgehalt nahm dabei ab. Der Ausgangswert wurde bei beiden Meßreihen gleich 1 gesetzt. Wie Abb. 5 zeigt, ergibt sich kein signifikanter Unterschied, wenn der Phytochromgehalt in Extrakten oder in den Keimlingen direkt bestimmt wird.

Auch bei der Untersuchung der lag-phase (Abb. 8, S.29) wurde der Phytochromgehalt einmal durch Extraktion und Messen am DMR 22 und zum anderen in den Keimlingen direkt bestimmt. Beide Meßmethoden brachten das gleiche Ergebnis: Der relative Phytochromgehalt (bezogen auf den Ausgangswert) ist zu jedem Zeitpunkt bei der Messung der Keimlinge identisch mit dem bei der Messung des Rohextraktes.

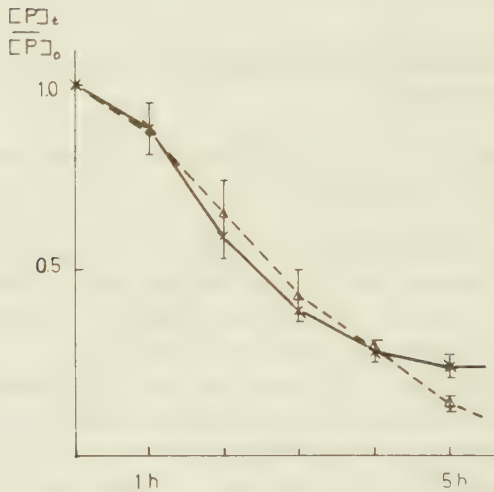


Abb. 5: Bestimmung des Phytochromgehaltes in vivo und in vitro am Beispiel der Destruktion in vivo; Bestimmung des Phytochromgehaltes erfolgte in Keimlingen (5 Keimlinge/Küvette) -x-x-, oder im Homogenat (hergestellt aus jeweils 5 g Keimlingen) -Δ-Δ-; nach 5 Stunden betrug der Meßwert in den Keimlingen $\Delta(\Delta E) = 0,0029$ und im Homogenat $\Delta(\Delta E) = 0,0006$.

3.1.4.2.) Bestimmung von Phytochrom in Gegenwart von Chlorophyll

Bei der spektralphotometrischen Bestimmung des Phytochromgehaltes ist auf absorbierende Pigmente zu achten. Insbesondere kann sich das Chlorophyll störend auswirken, da es durch Absorption von Rotlicht die Bestimmung des Phytochromgehaltes in Extrakten stört (BUTLER et al., 1959; SIEGELMAN, BUTLER, 1965; FURUYA, HILLMAN, 1964).

Neuere Untersuchungen zeigen, daß beim Messen der Differenz-

spektren in vivo Unterschiede auftreten können, die durch einen abschirmenden Effekt des Chlorophylls hervorgerufen werden (GRILL, 1972; JOSE et al., 1977; GRILL, 1977).

So untersuchten wir, ob nicht mit geeigneten Meßbedingungen diese störenden Einflüsse des Chlorophylls ausgeschaltet werden können.

Dazu wurden aus einer angereicherten Phytochromlösung zwei Verdünnungsreihen hergestellt: einmal durch Zugabe von steigenden Mengen an Puffer und zum anderen durch Zugabe von steigenden Mengen eines Rohextraktes aus grünen Keimlingen. Der Chlorophyllgehalt des Rohextraktes betrug $1,78 \mu\text{g/ml}$. Diese Proben wurden nun am Photometer gemessen. Die Bestrahlungszeiten zur Phototransformation betrugen 15 Sekunden HR und 30 Sekunden DR und verwendet wurden Bestrahlungslampen mit 250 bzw. 150 W. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 3: Störung durch Chlorophyll bei Bestimmung des Phytochromgehaltes in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität (250 W und 150 W); Bestrahlungsdauer: 15" HR, 30" DR; die Streuung der Meßwerte betrug im allgemeinen 2,5%; die Messung erfolgte am selbstgebauten Photometer.

Zugabe in ml	Puffer (250 W) $\Delta(\Delta E) \cdot 10^{-3}$	Chlorophyll (250 W) $\Delta(\Delta E) \cdot 10^{-3}$	Chlorophyll (150 W) $\Delta(\Delta E) \cdot 10^{-3}$	Chloro- phyllge- halt
0,5	57	64	54	$0,36 \mu\text{g/ml}$
1,0	43	45	41	$0,59 \mu\text{g/ml}$
2,0	30	33	28	$0,89 \mu\text{g/ml}$

Es zeigt sich, daß bei einer "normalen" Intensität der Bestrahlungslampe (250 W oder 150 W) Chlorophyll bis zu dem von uns untersuchten Gehalt von $0,89 \mu\text{g/ml}$ keinen Einfluß auf die Messung ausübt.

Es lassen sich also auch chlorophyllhaltige Proben ohne Schwierigkeiten messen, wenn eine vollständige Umwandlung der beiden Phytochromformen gewährleistet ist.

Eine Bestätigung dieses Ergebnisses brachte die vergleichende Messung chlorophyllhaltiger und chlorophyllfreier Phytochromlösungen unterschiedlicher Konzentrationen am DMR 22 und am selbstgebauten Photometer. Auch hier wurden jeweils Verdünnungsreihen aus einer angereicherten Phytochromlösung durch Zugabe von Puffer bzw. Rohextrakt aus grünen Keimlingen hergestellt.

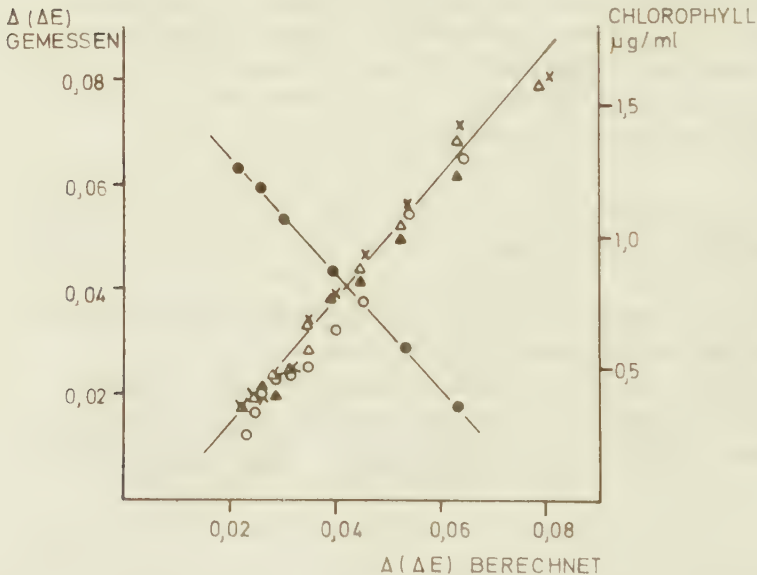


Abb. 6: Störender Einfluß des Chlorophylls beim Messen des Phytochromgehaltes; aufgetragen sind die gemessenen $\Delta(\Delta E)$ -Werte verschiedener Verdünnungsreihen gegen die berechneten $\Delta(\Delta E)$ -Werte und die zugehörigen Werte für den Chlorophyllgehalt; der Chlorophyllgehalt der Ausgangslösung betrug 1,78 $\mu\text{g/ml}$;

x : DMR Vergleich ▲ : Photometer + Chl.
○ : DMR + Chlorophyll ● : Chlorophyllgehalt
Δ : Photometer Vergleich

3.2.) Destruktion in vivo

3.2.1.) Änderung des Frischgewichtes der Keimlinge bei Dauerbelichtung

Untersucht man altersabhängige Reaktionen an biologischem Material, so ist auf eine einheitliche Bezugsgröße zu achten, denn im Verlauf des untersuchten Zeitraumes treten unter anderem Änderungen im Gewicht oder Volumen der Proben auf. Es könnte sich möglicherweise bei unseren Untersuchungen das Gewicht der Keimlinge ändern, wenn diese aus dem Brutschrank genommen und dem Dauerweißlicht ausgesetzt werden. Sollte hier z.B. eine Abnahme des Frischgewichtes durch Austrocknen der Keimlinge auftreten, so nimmt die Anzahl der Keimlinge pro 10 g Einwaage zu, d.h. es werden bei längerer Belichtung mehr Keimlinge eingewogen für 10 g. Der Verlauf der Destruktion in vivo kann dann nicht mehr korrekt verfolgt werden, wenn der Phytochromgehalt nach Extraktion bestimmt wird. Zur Überprüfung des Frischgewichtes bei Dauerbelichtung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 5 x 10 Keimlinge geerntet und gewogen.

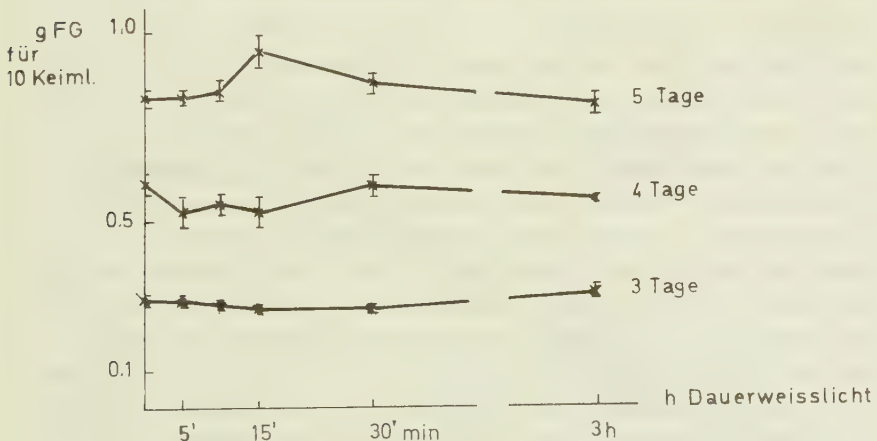


Abb. 7: Untersuchung der Änderung des Frischgewichtes bei Dauerbelichtung.

Es zeigt sich, daß das Frischgewicht der Keimlinge Schwankungen unterliegt, die jedoch in dem untersuchten Zeitraum bis zu 3 Stunden nicht signifikant sind.

Daher ist bei den von uns durchgeführten Untersuchungen, welche unter dem Aspekt der Altersabhängigkeit der Destruktion in vivo durchgeführt wurden, nur die Änderung des Keimlingsgewichtes während des Wachstums (3 Tage: 0,029 g/l Keimling; 4 Tage: 0,060 g/l Keimling; 5 Tage: 0,083 g/l Keimling) in Betracht zu ziehen. Im Versuchszeitraum ist das Keimlingsgewicht dann als konstant anzusehen.

3.2.2.) Änderung des Phytochromgehaltes bei Dauerbelichtung

Bei früheren Untersuchungen der Destruktion in vivo wurde der Phytochromgehalt stets in den Keimlingen direkt bestimmt, indem diese in kleinere Segmente geschnitten, in die Küvetten gepackt und so gemessen wurden (BUTLER et al., 1963; BUTLER, LANE, 1965; CHORNEY, GORDON, 1966).

Diese Bestimmung des Phytochromgehaltes in vivo könnte möglicherweise durch das Probenmaterial bedingte Fehler (z.B. Umverteilung in der Pflanzenzelle, Streuung der Proben; SPRUIT, 1972) beinhalten und daher keine genaue Beobachtung der Destruktion in vivo zulassen.

Derartige Meßfehler können jedoch ausgeschlossen werden, wenn der Phytochromgehalt nach Extraktion bestimmt wird.

Daher wurde von uns die Beobachtung der Destruktion in vivo nicht nur durch Messen der Keimlinge direkt am selbstgebauten Photometer durchgeführt, sondern der Phytochromgehalt in einer weiteren Versuchsreihe bestimmt nach Extraktion und Messen am DMR 22. Damit die Destruktion in den intakten Pflanzen ablaufen konnte, wurden diese für die Bestimmung des Phytochromgehaltes zu jedem angegebenen Zeitpunkt geerntet und extrahiert.

In dieser Versuchsreihe wurde ein Extrakt von jeweils 10 g Keimlingen hergestellt. Die $\Delta(\Delta E)$ -Werte zum Zeitpunkt $t = 0$ betrugen für 3 Tage: 0,024, für 4 Tage: 0,009 und für 5 Tage: 0,007. Die Keimlinge erhielten Dauerweißlicht unterschiedlicher Intensitäten im Bereich von 200 - 3000 Lux.

Bei der Bestimmung des Phytochromgehaltes in den Keimlingen

wurden jeweils 5 Keimlinge pro Kuvette gemessen mit den $\Delta(\Delta E)$ -
Werten zum Zeitpunkt $t = 0$ für 3 Tage: 0,012, für 4 Tage:
0,016 und für 5 Tage: 0,014. Die Keimlinge erhielten Dauer-
weißlicht von 2000 Lux.

Extrakt von 10g
 $\Delta(\Delta E)$ berechnet für 1Keiml.

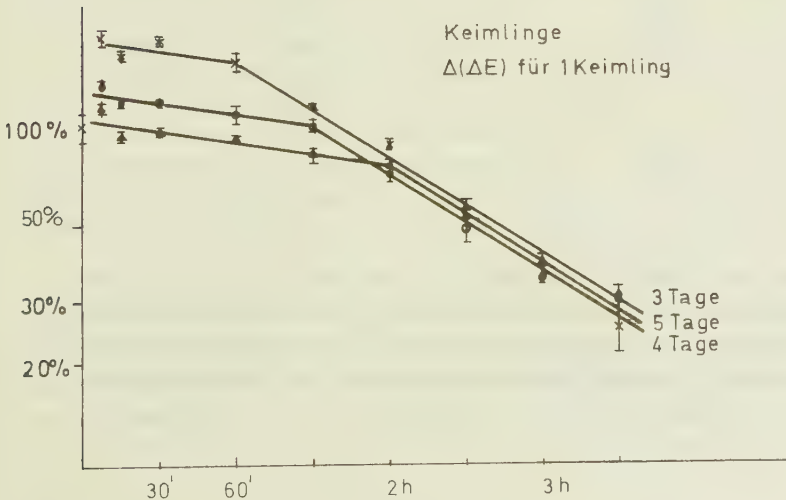
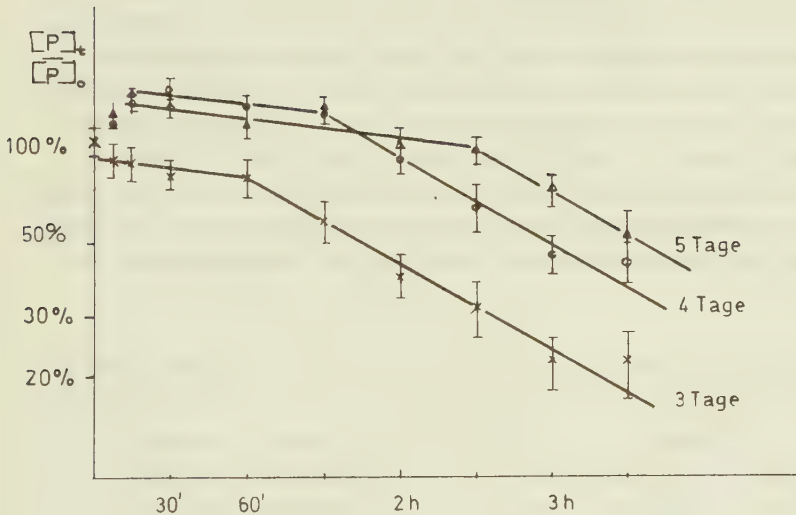


Abb. 8: Verlauf der Destruktion in vivo; untersucht bei 3, 4 und 5 Tage alten Keimlingen unter Dauerweißlicht verschiedener Intensitäten. Extrakt: Weißlicht im Bereich von 200-3000 Lux, welche für diese Abbildung zusammengefaßt wurden; Keimlinge: 2000 Lux; die Phytochromkonzentration ist angegeben pro 1 Keimling; die Meßwerte sind bezogen auf den Wert zur Zeit $t = 0$ (= etiolierte Probe), welcher = 100% gesetzt wurde.

Die zu beobachtende Destruktion läßt sich in eine langsame und eine schnelle Phase aufteilen, wobei zunächst die langsame Phase (lag-phase der Destruktion) auftritt. Verbindet man nun die Meßpunkte jeweils der langsamen und der schnellen Phase mit Geraden, so zeigt der Schnittpunkt der Geraden die ungefähre Begrenzung der lag-phases an. Die lag-phase hält je nach Alter der Keimlinge unterschiedlich lange an: mit zunehmendem Alter der Keimlinge tritt eine Verlängerung der lag-phase auf.

Tabelle 4: Dauer der lag-phase in Abhängigkeit vom Keimlingsalter.

Alter der Keimlinge	Extraktion	Keimlinge direkt
3 Tage	60 Min. $\pm$ 10 Min.	60 Min. $\pm$ 10 Min.
4 Tage	90 Min. $\pm$ 10 Min.	90 Min. $\pm$ 10 Min.
5 Tage	150 Min. $\pm$ 20 Min.	120 Min. $\pm$ 10 Min.

Nach der lag-phase ist die Destruktionsrate bei allen in etwa gleich schnell. Die Halbwertszeit für die Abnahme des Phytochromgehaltes nach der lag-phase beträgt bei der Bestimmung der Keimlinge ungefähr 60 Minuten und bei der Bestimmung der Extrakte ungefähr 70 Minuten. SCHÄFER et al. (1975) fanden für Hafer 90 Minuten.

3.2.3.) Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Es stellt sich nun die Frage, ob die Verlängerung der lag-phase, welche mit zunehmendem Alter der Keimlinge auftritt, durch einen Alterungsprozess der Keimlinge hervorgerufen wird. Eine altersbedingte Abnahme der Stoffwechselaktivität sollte auch bei dem Sauerstoffverbrauch der Atmung unterschiedlich alter Keimlinge sichtbar werden. Daher untersuchten wir den Sauerstoffverbrauch bei 3, 4 und 5 Tage alten Keimlingen bei Dauerweißlicht oder im Dunkeln.

Dieser ist unabhängig davon, ob die Keimlinge dunkel gehalten oder belichtet werden. In dem untersuchten Zeitraum ist die Atmungsrate in beiden Fällen gleich (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von 3, 4 und 5 Tage alten Haferkeimlingen im Dunkeln oder bei Dauerweißlicht; angegeben ist der Verbrauch pro Stunde jeweils für 1,0 g Frischgewicht bzw. 1 Keimling.

Alter (Tage)	Bezugsgröße	dunkel $\mu\text{l O}_2/\text{h}$	belichtet $\mu\text{l O}_2/\text{h}$
3	1,0 g Frischgew. 1 Keimling	512,4 10,2	517,2 10,3
4	1,0 g Frischgew. 1 Keimling	325,2 14,8	327,6 14,9
5	1,0 g Frischgew. 1 Keimling	297,6 19,2	295,2 19,0

In der folgenden Abbildung 9 ist die Atmungsrate der 3, 4 und 5 Tage alten Haferkeimlinge dargestellt, wobei als Bezugsgröße einmal 1,0 g Frischgewicht und zum anderen 1 Keimling gewählt wurde.

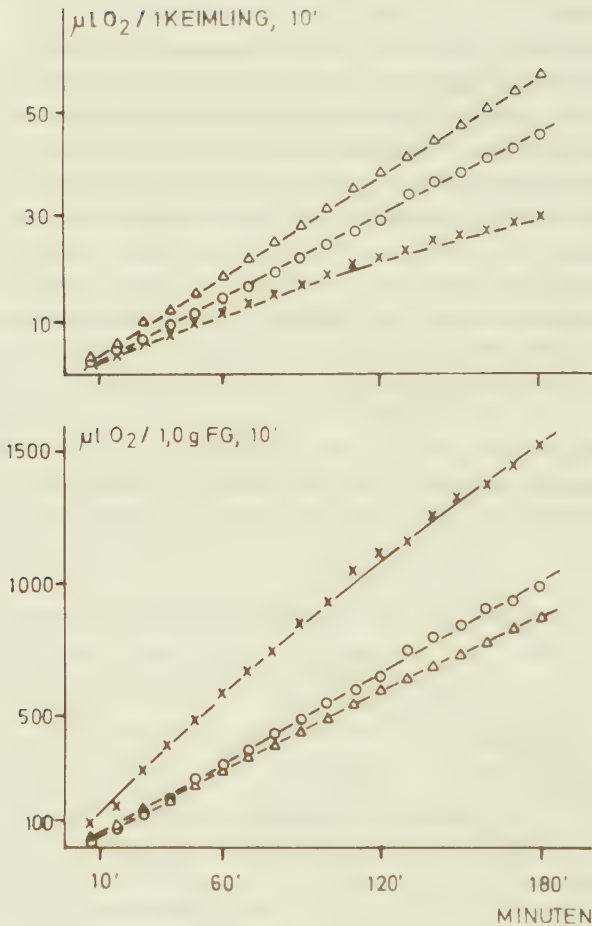


Abb. 9: Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei unterschiedlichem Alter der Keimlinge im Dunkeln und bei Dauerweißlicht. Jeder angegebene Meßwert wurde aus 12 Bestimmungen ermittelt, wobei Dunkel- und Dauerweißlicht-Werte zusammengefaßt wurden; die Streuung der Meßwerte beträgt 6%.

-x-x- = 3 Tage

-o-o- = 4 Tage

- Δ - Δ - = 5 Tage

Setzt man 1,0 g Frischgewicht als Bezugsgröße, so zeigt sich eine deutliche Abnahme des Sauerstoffverbrauchs mit zunehmendem Keimlingsalter. 3 Tage alte Keimlinge verbrauchen mehr als 4 oder 5 Tage alte Keimlinge. Ein umgekehrtes Bild ergibt sich, wenn die Atmungsrate pro Keimling bestimmt wird. Hier tritt eine Zunahme der Atmungsrate in der Reihenfolge $3 < 4 < 5$ Tage auf.

3.2.4.) Anstieg des Phytochromgehaltes in vivo bei Beginn der Dauerweißlichtbelichtung

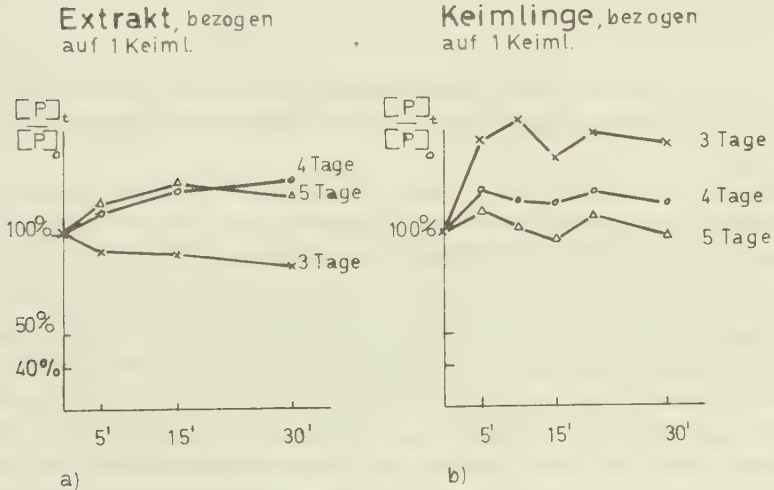


Abb. 10: Anstieg des Phytochromgehaltes innerhalb der ersten 30 Minuten Dauerweißlicht-Belichtung; der Phytochromgehalt wurde für 1 Keimling berechnet und ist jeweils bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt $t = 0$; a): die Bestimmung des Phytochromgehaltes erfolgte nach Extraktion von jeweils 10 g Keimlingen, die Lichtintensitäten im Bereich von 200-3000 Lux wurden in dieser Abb. zusammengefaßt. b): hier wurden jeweils 5 Keimlinge pro Kuvette gemessen, die Lichtintensität betrug 2000 Lux.

Bei näherer Betrachtung der ersten 30 Minuten Dauerweißlicht zeigt sich noch keine Destruktion, sondern es tritt ein Ansteigen des Phytochromgehaltes über den Wert der etiolierten Probe hinaus auf. Dann stellt sich ein scheinbar periodisches Schwanken des Phytochromgehaltes ein. Auch zeigt sich eine Abhängigkeit vom Keimlingsalter, da bei 3 Tage alten Keimlingen Anstieg und Schwanken stärker ausgeprägt sind als bei 4 und 5 Tage alten Keimlingen.

Dies ist jedoch nur bei der Bestimmung des Phytochromgehaltes in vivo (Messen der Keimlinge direkt) zu beobachten. Nach Extraktion und Messen des Phytochroms in vitro zeigt sich nur bei 4 und 5 Tage alten Keimlingen ein Ansteigen des Phytochromgehaltes, jedoch nicht bei 3 Tage alten Keimlingen. Hier setzt bei Beginn der Belichtung Destruktion ein.

3.2.5.) Einfluß der Lichtintensität auf die Photoreversibilität bei Beginn der Dauerbelichtung mit Weißlicht

In den ersten 15 Minuten nach Beginn der Belichtung konnte ein Einfluß der Lichtintensität im Bereich von 200-3000 Lux auf den Phytochromgehalt nachgewiesen werden.

Je nach Intensität des Weißlichtes und nach Alter der Keimlinge läßt sich bei Beginn der Belichtung ein Ansteigen oder eine Abnahme des Phytochromgehaltes beobachten. Bei 3 Tage alten Keimlingen induziert eine geringe Lichtintensität von 200 Lux ein leichtes Ansteigen, wogegen bereits 1000 Lux (und mehr) eine deutliche Abnahme des Phytochromgehaltes bewirken. In 5 Tage alten Keimlingen wird durch das eingestrahlte Licht eine Zunahme an Phytochrom hervorgerufen. Diese Zunahme ist intensitätsabhängig, da sie bei einer geringen Lichtintensität am stärksten ausgeprägt ist und mit steigender Intensität abnimmt.

4 Tage alte Keimlinge zeigen kein so deutliches Bild. Hier ist nur bei 1000 Lux eine geringe Abnahme zu beobachten, wogegen alle anderen untersuchten Lichtintensitäten eine Zunahme des Phytochromgehaltes bewirken.

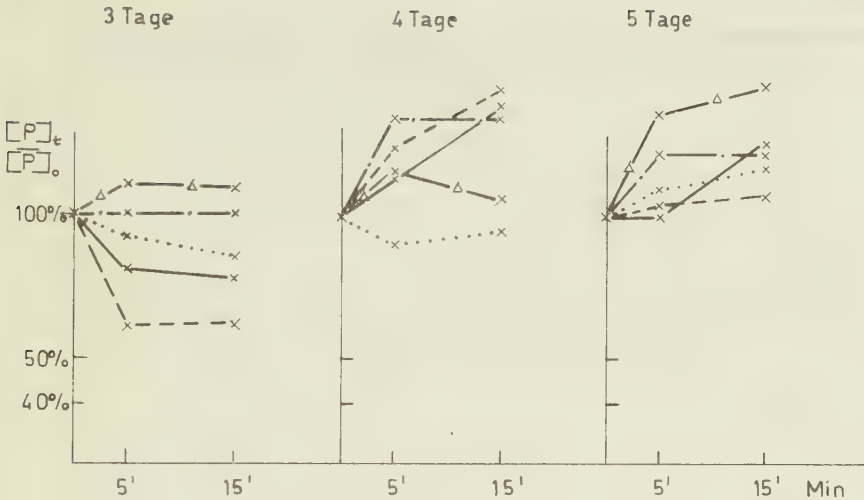


Abb. 11: Abhängigkeit des Phytochromgehaltes von eingestrahelter Lichtintensität und Alter der Keimlinge bei Beginn der Dauerweißlicht-Belichtung; der Phytochromgehalt wurde nach Extraktion aus 10 g Keimlingen bestimmt und die Meßwerte sind bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt $t = 0$, welcher = 100% gesetzt wurde.

————— 3000 Lux
 ----- 2000 Lux
 1000 Lux
 -.-.-.-. 500 Lux
 —△— 200 Lux

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei jüngeren Keimlingen (hier 3 Tage) durch Weißlicht hauptsächlich eine sofortige Abnahme des Phytochromgehaltes hervorgerufen wird, wogegen bei älteren Keimlingen (hier 5 Tage) eine anfängliche Zunahme an Phytochrom zu beobachten ist. Die Zu- bzw. Abnahme des Phytochromgehaltes ist jeweils abhängig von der Intensität des eingestrahlichten Lichtes: bei hoher Intensität tritt eine starke

Abnahme (3 Tage) auf, bei geringer Intensität eine starke Zunahme (5 Tage).

Nach Beendigung der lag-phase läßt sich ein Einfluß der Lichtintensität auf die Destruktion nicht mehr nachweisen (Abb. 12).

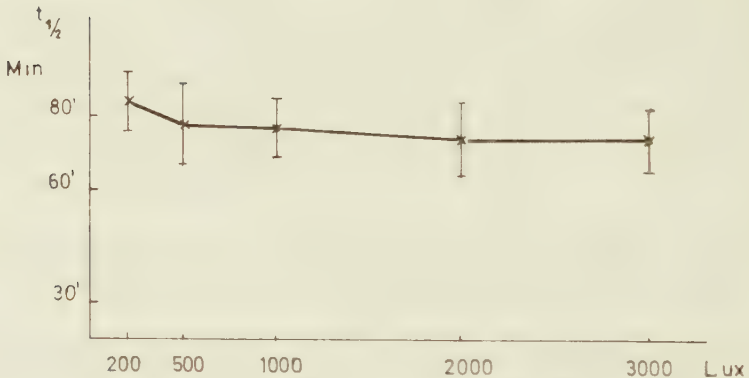


Abb. 12: Einfluß der Lichtintensität des Weißlichtes auf die Destruktion in vivo nach der lag-phase; ermittelt wurden die Halbwertszeiten der Destruktionsraten, welche bei den unterschiedlichen Intensitäten auftraten.

Auch die Halbwertszeit für die Destruktion bei 200 Lux ist nicht signifikant von der bei 500-3000 Lux verschieden.

In dem von uns untersuchten Bereich von 200-3000 Lux hat die Intensität des Weißlichtes demnach keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Destruktion nach der lag-phase.

3.2.6.) Neusynthese des Phytochroms

Eine weitere mögliche Erklärung für den Anstieg des Phytochromgehaltes in den ersten 30 Minuten nach Beginn der Belichtung, könnte die Neusynthese von Phytochrom sein, welche in Wechselwirkung tritt mit der einsetzenden Destruktion.

Daher versuchten wir, eine Neusynthese des Phytochroms nachzuweisen.

Die unterschiedlichen Belichtungen der 4 Tage alten, etiolierten Haferkeimlinge induzierten in etwa eine gleich schnelle Destruktion des Phytochroms. 4 Stunden nach Beginn der Belichtung ließen sich bei 5' HR belichteten Keimlingen noch 30%, bei Dauerhellrot noch 29% und bei Dauerweißlicht noch 25% des Phytochromgehaltes der etiolierten Keimlinge (=100%) nachweisen.

Die Bestimmung des Phytochromgehaltes erfolgte durch Messen nach Extraktion oder Messen der Keimlinge direkt.

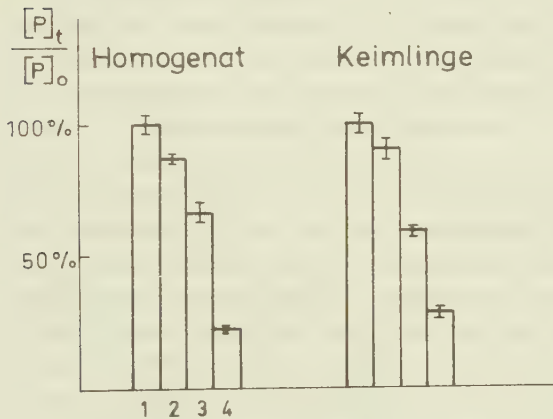


Abb. 13: Änderung des Phytochromgehaltes nach Belichtung und Dunkelphase bei Hafer; die Meßwerte sind bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt $t = 0$, welcher 100% gesetzt wurde; 1: etiolierte Probe; 2: nach 1,5 Stunden Belichtung (5' HR, DauerHR, Dauerweißlicht zusammengefaßt); 3: nach 2 Stunden Dunkelphase; 4: nach 4 Stunden Dunkelphase.

Unabhängig von der Meßmethode (Homogenat oder Keimlinge) zeigt sich in beiden Fällen Destruktion und auch in der 4-stündigen

Dunkelphase kein Ansteigen des Phytochromgehaltes.

Die Bestimmung des Phytochromgehaltes in der Dunkelphase war erforderlich, da neugebildetes Phytochrom als P_r vorliegt und bei Belichtung gleich in P_{fr} umgewandelt und so der Destruktion unterliegen würde. Neusynthese des Phytochroms sollte daher in der Dunkelphase als Zunahme des Phytochromgehaltes sichtbar geworden sein.

Dies war jedoch bei den von uns untersuchten Haferkeimlingen nicht zu beobachten. Daher führten wir zur Kontrolle Versuche an Gerste, Hirse und Weizen durch.

Hafer, Gerste und Hirse zeigen auch in der 4-stündigen Dunkelphase eine weitere Destruktion. Beim Weizen findet zunächst auch Destruktion statt, dann jedoch bleibt der Phytochromgehalt in der Dunkelphase konstant auf 40% des ursprünglichen Gehaltes. Bei allen läßt sich jedoch keine Zunahme des Phytochromgehaltes ($\approx$ Neusynthese) beobachten.

Senf der Bayerischen Futter- und Saatbau-Vereinigung GmbH, München, zeigt eine Destruktion bis zu etwa 60% des ursprünglichen Phytochromgehaltes nach 1,5 h Belichtung, jedoch keinen Anstieg des Phytochromgehaltes in der nachfolgenden Dunkelphase. In dem von Herrn MARMÉ zur Verfügung gestellten Senf findet bei 1,5 h Belichtung Destruktion statt bis auf etwa 40% des ursprünglichen Gehaltes. In der nachfolgenden Dunkelphase tritt eine Neusynthese auf, so daß nach 4 Stunden Dunkelphase 65% des ursprünglichen Phytochromgehaltes wieder erreicht sind. MARMÉ (1969 a) beschreibt auch eine Destruktion auf 40% und eine Neusynthese auf 72% des Phytochromgehaltes vor der Belichtung.

In der Abbildung 14 wurden die Versuchsreihen der Haferkeimlinge zusammengefaßt.

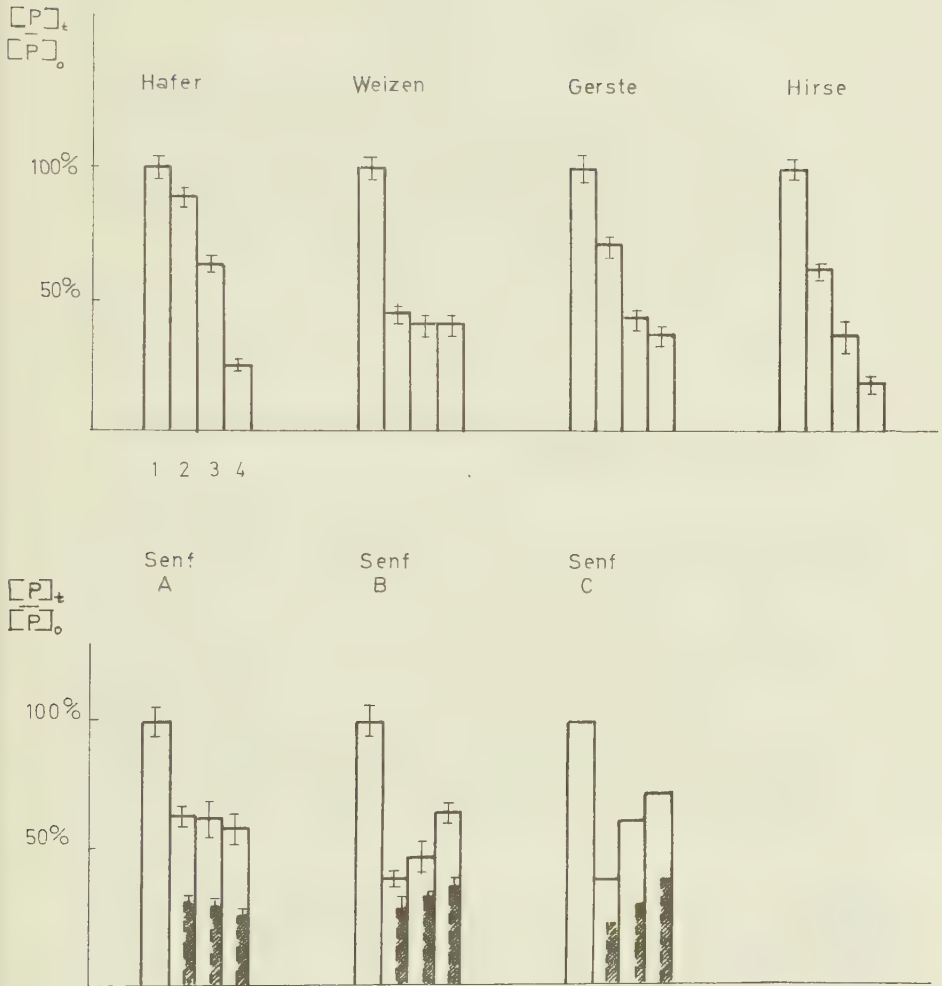


Abb. 14: Änderung des Phytochromgehaltes nach Belichtung und Dunkelphase in vivo. Bestimmung des Phytochromgehaltes (P_{total}) durch Messen in vivo oder Extraktion bei Hafer, Gerste, Weizen, Hirse; durch Messen in vivo bei Senf.

1. etiolierte Probe;
2. nach Belichtung (1,5 h HR);
3. nach 2 h Dunkelphase;
4. nach 4 h Dunkelphase;

bei Senf:  Kotyledonen
 Hypocotyl

Senf A: wurde bezogen von der Firma Bayerische Futter- und Saatbau-Vereinigung GmbH München; Senf B: wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. MARMÉ, Freiburg, zur Verfügung gestellt; Senf C: aus der Literatur entnommene Werte (MARMÉ, 1969 a).

3.2.7.) Untersuchung der Destruktion in vivo mit Hilfe der Membranbindungsmethode

Die Isolierung von membrangebundenem Phytochrom ermöglicht eine differenzierte Bestimmung der Destruktion in vivo, da mit dieser Methode untersucht werden kann, ob das Phytochrom in der gebundenen und/oder in der löslichen Fraktion der Destruktion unterliegt. BOISARD et al. (1974) konnten zeigen, daß bei Kürbis nicht nur die gebundene Phytochromfraktion angegriffen wird, sondern bei Dauerhellrotlicht auch die lösliche Fraktion nach einer lag-phase von 30 Minuten der Destruktion unterliegt. Ein kurzer Hellrotstoß von 3 Minuten rief in der löslichen Fraktion keine Destruktion hervor.

Daher haben wir in den von uns untersuchten Haferkeimlingen Destruktion in vivo induziert durch einen Hellrotstoß von 8 Minuten und in einer weiteren Versuchsreihe durch Dauerweißlicht von 2000 lux.

Der Phytochromgehalt der löslichen Fraktion (KS) bleibt bis zu 2 Stunden fast konstant, nimmt dann jedoch stark ab, wobei die Destruktion in den Keimlingen, welche Dauerweißlicht erhielten, stärker ausgeprägt ist. In der gebundenen Phytochromfraktion (KS') ist der Unterschied zwischen 8' HR und Dauerweißlicht belichteten Keimlingen nicht so ausgeprägt.

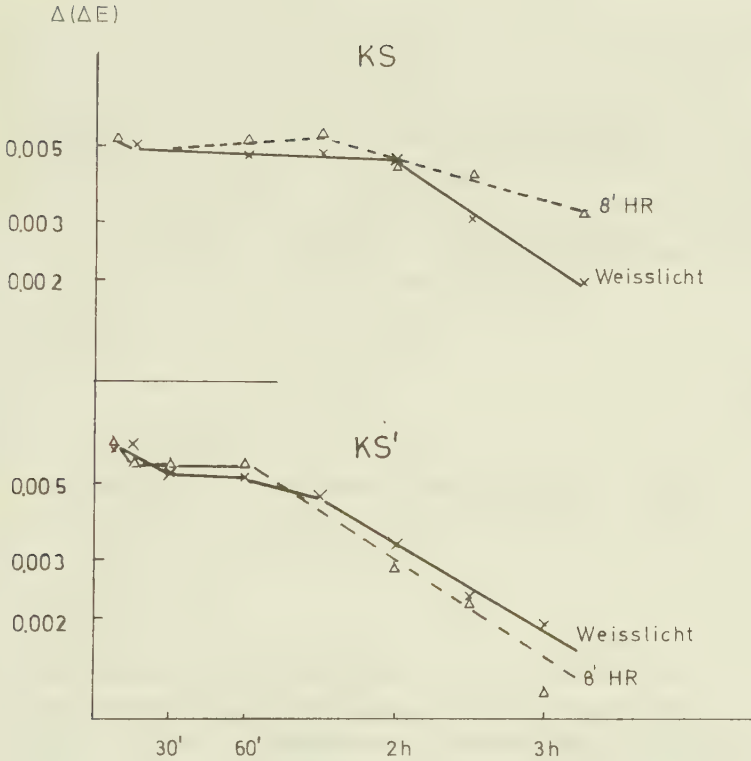


Abb. 15: Destruktion in vivo: Bestimmung der löslichen und pelletierbaren Fraktion; die 4 Tage alten Hafer-keimlinge erhielten Dauerweisslicht von 2000 Lux oder 8' HR in vivo; der Phytochromgehalt ist angegeben für 10 g Keimlinge und wurde am DMR 22 bestimmt.

Faßt man beide Versuchsreihen zusammen, so zeigt sich folgende Verteilung der löslichen und gebundenen Fraktion im Verlauf der Destruktion in vivo.

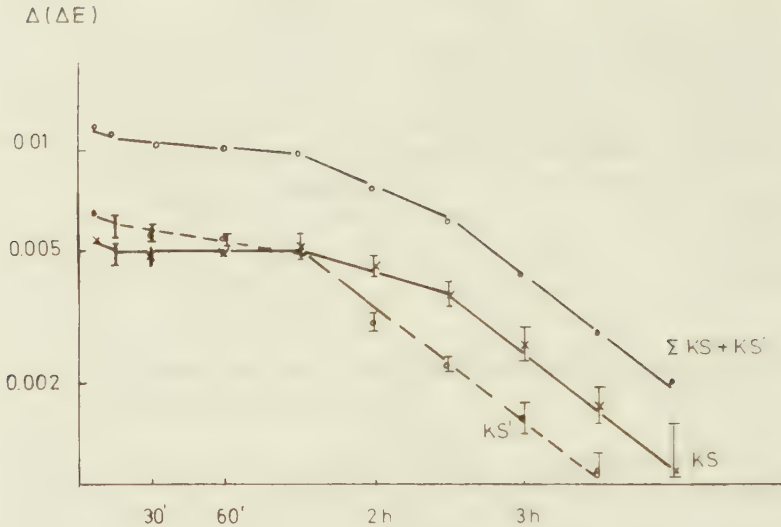


Abb. 16: Destruktion in vivo: Kinetiken der gebundenen und löslichen Fraktionen; die Proben der unterschiedlichen Belichtungen (Dauerweißlicht und 8' HR) wurden zusammengefaßt (siehe Abb. 14).

Der Verlauf der Destruktion von KS und KS' (Summe der löslichen und pelletierbaren Fraktion) zeigt das "normale" Bild der Destruktion in vivo der 4 Tage alten Keimlinge: bis zu 1,5 Stunden ist eine langsame Destruktion vorhanden, die dann jedoch stark beschleunigt wird. Der Anteil an löslicher Fraktion (20 KS) in den Keimlingen bleibt bis zu 1,5 Stunden konstant. Danach zeigt sich zunächst eine langsame, dann eine schnelle Abnahme des Phytochromgehaltes. Bei der gebundenen Fraktion unterliegt das Phytochrom gleich von Anfang an einer langsamen Destruktion (eine Art lag-phase). Nach 1,5 Stunden tritt auch hier eine Beschleunigung der Destruktion auf.

3.2.8.) Molekulargewichtsbestimmung von membrangebundenem
Phytochrom vor und nach Destruktion

Wie PRATT et al. (1974) zeigen konnten, beinhaltet Destruktion unter anderem einen Verlust an extrahierbarem Phytochromprotein, welcher durch einen proteolytischen Abbau bedingt sein könnte. Die Molekulargewichtsbestimmung ermöglicht hier eine nähere Charakterisierung der Destruktion. Daher haben wir Molekulargewichtsbestimmungen von membrangebundenem Phytochrom vor und nach Destruktion durchgeführt.

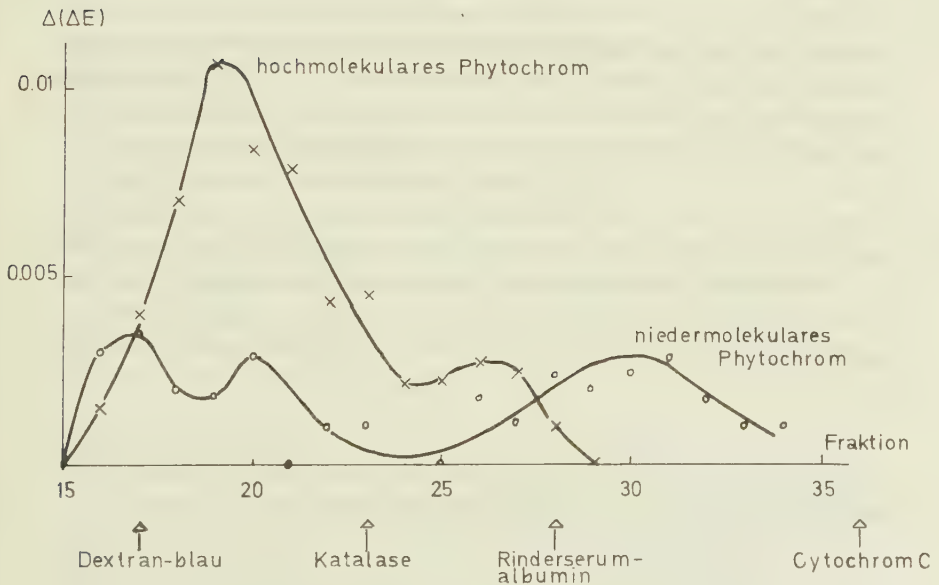


Abb. 17: Molekulargewichtsbestimmung von membrangebundenem Phytochrom an Sephadex G-200; Kalibrierung der Säule erfolgte mit Dextranblau, Katalase, Rinderserumalbumin, Cytochrom c; aufgetragen wurden je 2 ml Phytochromfraktion aus unterschiedlich belichteten Keimlingen;
-x-x- 8' HR -o-o- 32 h Weißlicht

Die verwendeten 4 Tage alten Keimlinge erhielten 8 Minuten Hellrot und wurden dann sofort extrahiert oder sie erhielten 32 Stunden Weißlicht, so daß sie zum Zeitpunkt der Extraktion genau 4 Tage alt waren. Damit läßt sich ein Vergleich ziehen zwischen dem Molekulargewicht von membrangebundenem Phytochrom, welches noch nicht der Destruktion unterliegt (8 Minuten Hellrot), und dem eines membrangebundenen Phytochroms, bei welchem Destruktion stattgefunden hat (32 Stunden Weißlicht).

Bei den 8 Minuten Hellrot belichteten Keimlingen zeigt sich bereits ein Anstieg des Hauptpeaks bei einem Molekulargewicht von $\geq 800\ 000$, das Maximum liegt jedoch bei $520\ 000$. Ein weiterer, kleinerer Peak tritt auf bei einem Molekulargewicht von $110\ 000$.

Eine Verschiebung der Molekulargewichte in Richtung zu niedermolekularem Phytochrom hin, zeigt sich nach 32 Stunden Belichtung mit Weißlicht. Hier befindet sich ein Teil des Phytochroms in der Fraktion mit dem Molekulargewicht von $\geq 800\ 000$, davon getrennt lassen sich Molekulargewichte von $420\ 000$ und $47\ 000$ nachweisen. Phytochrom mit dem Molekulargewicht von $47\ 000$ ist in der 8 Minuten Hellrot belichteten Probe nicht beobachtet worden, jedoch weisen beide Proben (8' Hellrot und 32 h Weißlicht) ein Phytochrom mit einem Molekulargewicht von $\geq 800\ 000$ auf.

Die Molekulargewichte sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 5: Bestimmung der Molekulargewichte von membrangebundenem Phytochrom vor und nach Destruktion

ohne Destruktion (8' HR)	nach Destruktion (32 h Weißlicht)
MG $\geq 800\ 000$	MG $\geq 800\ 000$
520 000	420 000
110 000	47 000

4.) Diskussion

Mit dem von uns gebauten Photometer läßt sich der Phytochromgehalt in Keimlingen und Extrakten gut und schnell bestimmen. In dem bisher verwendeten DMR 22 sind keine streuenden Proben meßbar, da der Photomultiplier von der Küvette weit entfernt ist. Auch bestand für uns bis dahin noch keine Möglichkeit, Phytochrombestimmungen in vivo durchzuführen, also Keimlinge direkt zu messen. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß ein Vergleich der Meßwerte (ΔE -Signale verschieden konzentrierter Dextranblaulösungen und $\Delta(\Delta E)$ -Werte von phytochromhaltigen Verdünnungsreihen) mit dem sonst zu Phytochrommessungen verwendeten DMR 22 ohne weiteres möglich ist.

Bei Messen in vivo zeigte sich, daß auch eine Umverteilung des Phytochroms in der Pflanzenzelle nach Belichtung (MACKENZIE et al., 1975) keinen negativen Einfluß ausübt. Es wären sonst Unterschiede im Verlauf der Destruktion sichtbar geworden bei der Gegenüberstellung der Bestimmungen des Phytochromgehaltes in Keimlingen und im Homogenat (Abb. 5).

Eine neuere Untersuchung (BRITZ et al., 1977) zeigt, daß Änderungen in der intrazellulären Verteilung von Phytochrom keinen Einfluß haben auf die gebräuchlichen spektralphotometrischen Bestimmungen in vivo und ist somit eine Bestätigung für unsere Beobachtungen.

Nach GRILL (1977) bewirkt der Einfluß des Chlorophylls eine Abnahme des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes. Dieses ist wohl eher auf eine nicht vollständige Photoumwandlung des Phytochroms zurückzuführen (JOSE et al., 1977) als auf eine Beeinträchtigung der Messung durch Chlorophyllfluoreszenz (SIEGELMAN, BUTLER, 1965). Ein Chlorophyllgehalt von 12 $\mu\text{g/ml}$ reduzierte den $\Delta(\Delta E)$ -Wert einer Messung bereits um 50% (JOSE et al., 1977). Bei ihren Versuchen haben sie in Methanol gelöstes Chlorophyll zugegeben und verwendeten dementsprechend einen hohen Chlorophyllgehalt. Für die praktische Messung muß jedoch nur der in Wasser gehende Chlorophyll-Anteil (löslicher Chlorophyll-Protein-Komplex) berücksichtigt werden, da Phytochrom stets mit Puffer extra-

hiert wird. So enthielt bei unserer Untersuchung über den störenden Einfluß des Chlorophylls der verwendete Rohextrakt - hergestellt aus mit 12 Stunden Dauerweißlicht belichteten Keimlingen - nur 1,78 $\mu\text{g/ml}$ Chlorophyll.

Bei den Untersuchungen der Destruktion in vivo wurden de-etio-lierte Keimlinge gemessen. Diese enthalten zunächst nur das durch Licht aus dem vorhandenen Protochlorophyll umgewandelte Chlorophyll und erst nach 12 Stunden ist etwa das 100fache des ursprünglichen Gehaltes erreicht (STEFFENS et al., 1976; SCHOCH et al., 1977). Unsere Untersuchungen zur Destruktion in vivo wurden jedoch nur bis zu 4-5 Stunden Dauerweißlicht durchgeführt, und in diesem Zeitraum kann für unsere Messungen der Chlorophyllgehalt vernachlässigt werden.

Mit Hilfe der unterschiedlichen Meßmethoden (Messen nach Extraktion oder Messen der Keimlinge direkt) wurde die Destruktion in vivo untersucht.

Die von uns beobachtete Verlängerung der lag-phase bei zunehmendem Alter der Keimlinge steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von KIDD und PRATT (1973), die nur bei 3, jedoch nicht bei 4 und 5 Tage alten Haferkeimlingen eine lag-phase der Destruktion fanden. Diese lag-phase führen sie darauf zurück, daß in 3 Tage alten Keimlingen zunächst ein destruirendes System synthetisiert werden muß, welches bei 4 und 5 Tage alten Keimlingen bereits gebildet ist. Dies kann mit den von uns durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Wir finden nicht nur bei 3, sondern auch bei 4 und 5 Tage alten Keimlingen eine lag-phase, welche sich verlängert mit zunehmendem Alter der Keimlinge.

Eine mögliche Erklärung für die Verlängerung der lag-phase könnte auf der Änderung der Stoffwechselaktivität der Keimlinge beruhen. Daher bestimmten wir die Atmungsrate der 3, 4 und 5 Tage alten Keimlinge.

Wenn man als Bezugsgröße 1,0 g Frischgewicht wählt, nimmt die Atmungsrate mit zunehmendem Alter der Keimlinge ab. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn die Atmungsrate bestimmt wird pro 1 Keimling. Hier nimmt sie mit zunehmendem Alter der Keimlin-

ge zu. So läßt sich die Änderung der lag-phase nicht auf eine Änderung der Stoffwechselaktivität der Keimlinge zurückführen.

Der von uns beobachtete Einfluß der Lichtintensität auf den Phytochromgehalt während der lag-phase ist bisher noch nicht beschrieben worden. Hier wird bei jüngeren Keimlingen (3 Tage) hauptsächlich eine Abnahme des Phytochromgehaltes hervorgerufen, welche mit steigender Lichtintensität ausgeprägter ist. Bei älteren Keimlingen (5 Tage) ist eine Zunahme an Phytochrom zu beobachten. Diese wiederum ist bei geringen Lichtintensitäten am stärksten und nimmt mit steigender Intensität ab. Möglicherweise handelt es sich hierbei um zwei gegenläufige Prozesse: Destruktion und Neusynthese, wobei in 3 Tage alten Keimlingen primär Destruktion ausgelöst wird. Nach Beendigung der lag-phase überwiegt die Destruktion, und es läßt sich bei dem von uns verwendeten Weißlicht im Bereich von 200-3000 Lux kein Einfluß auf die Destruktion nach der lag-phase nachweisen. Eine neuere Untersuchung der P_{total} -Destruktion bei Hafer in Abhängigkeit von eingestrahelter Wellenlänge und Energiemenge zeigt, daß bei Licht der Wellenlänge 660 nm die Destruktion bereits gesättigt ist bei $1,5 \text{ W.m}^{-2}$ (SCHÄFER et al., 1975). So wird verständlich, daß die von uns verwendeten 200 Lux eine Sättigung der Destruktion nach der lag-phase bedeuten, da 200 Lux ca. $2,1 \text{ W.m}^{-2}$ entsprechen.

Der Anstieg des Phytochromgehaltes zu Beginn der Belichtung läßt sich nicht mit der Änderung des Frischgewichtes der Keimlinge erklären. Das Frischgewicht unterliegt zwar gewissen Schwankungen (3 Tage: -7%; 4 Tage: +0,4%; 5 Tage: +5% während der ersten 30 Minuten Belichtung), jedoch sind diese Änderungen nicht so ausgeprägt, als daß sie die Bestimmung des Phytochromgehaltes beeinflussen.

Bei Senf (MARMÉ et al., 1971) wurde in den ersten 10 Minuten nach saturierender HR-Belichtung ein ähnliches Schwanken des Phytochromgehaltes beobachtet. Die Autoren beschreiben eine Abnahme und danach einen Anstieg auf 100% des ursprünglichen Gehaltes, so daß nach den ersten 10 Minuten als Summe noch

keine Destruktion auftritt (siehe Kapitel 3.2.2.: lag-phase). Aus ihren Untersuchungen schließen sie auf ein Zwischenprodukt, welches nach der ersten Belichtung etwa 20% des Gesamtphytochroms ausmacht und sich in der anschließenden Dunkelphase in P_r und P_{fr} umwandelt.

Bei unseren Untersuchungen wurden die Haferkeimlinge nicht nur kurzzeitig mit HR bestrahlt wie bei MARMÉ et al. (1971), sondern erhielten Dauerweißlicht. Eine Art "Dunkelreaktion" wie bei dem von MARMÉ et al. untersuchten Senf kann also nicht vorliegen.

Eine mögliche Erklärung für den Anstieg des Phytochromgehaltes bei Beginn der Belichtung ist die Wechselwirkung von Neusynthese und Destruktion (siehe auch Intensitätsabhängigkeit während der lag-phase). In etiolierten Keimlingen ist ein bestimmter Gehalt an Phytochrom vorhanden, welches als P_r vorliegt (BUTLER et al., 1963). Dieser Gehalt an P_r ändert sich in etiolierten Keimlingen mit dem Alter der Keimlinge (CORRELL, SHROPSHIRE, 1968; BUTLER, LANE, 1965), so daß immer ein bestimmter "pool" an P_r vorliegt. Bei Belichtung wird dieser P_r -pool fast vollständig entleert, da das P_r zum größten Teil (80%) in P_{fr} umgewandelt wird (BUTLER et al., 1964). Durch das Entleeren des P_r -pools wird das stationäre Gleichgewicht in der etiolierten Zelle extrem gestört und es setzt sofort eine Neusynthese von P_r ein. Neusynthese von Phytochrom bedeutet eine Synthese von P_r (MARMÉ, 1969 a), welches bei unseren Versuchsbedingungen (Dauerweißlicht) wieder in P_{fr} umgewandelt wird. P_{fr} jedoch unterliegt der Destruktion.

So tritt eine Wechselwirkung zwischen Synthese (Ansteigen des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes) und Destruktion ein (Abnahme des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes), bei der zu einem späteren Zeitpunkt (nach der lag-phase) die Destruktion überwiegt.

Die Wechselwirkung zwischen P_{fr} -Destruktion und P_r -Synthese wird von CLARKSON und HILLMAN (1968) als mögliche Erklärung für einen konstanten Gehalt an Phytochrom bei Dauerbelichtung herangezogen. TANADA (1977) konnte zeigen, daß Weißlicht und DR-Licht Synthese von Phytochrom in zuvor dunkel gehaltenen

Zellsuspensionen induzieren kann. Inzwischen wurde Neusynthese auch beschrieben bei Mais, wobei die Synthese von dem Gehalt an P_{total} und P_{fr} (DUKE et al., 1977) kontrolliert werden kann. Die bisher in der Literatur beschriebene Neusynthese von Phytochrom läuft nach Ablauf der Destruktion über einen Zeitraum von mehreren Stunden ab. Der von uns beobachtete Anstieg des Phytochromgehaltes tritt jedoch sofort bei Beginn der Dauerweißlichtbelichtung auf und kann daher zumindest zeitlich nicht mit den sonst in der Literatur beschriebenen Neusynthesen korreliert werden.

Daher untersuchten wir, ob bei den von uns verwendeten Haferkeimlingen nach Ablauf der Destruktion eine Neusynthese von Phytochrom induziert werden kann, welche bisher noch nicht beschrieben wurde.

Es zeigte sich, daß bei den von uns untersuchten Haferkeimlingen nach Ablauf der Destruktion keine Neusynthese (Zunahme an $\Delta(\Delta E)$) induziert bzw. nachgewiesen werden konnte. Dabei können Fehler aufgrund der Meßmethode ausgeschlossen werden, da der Phytochromgehalt in mehreren Versuchsreihen nach Extraktion und in vivo bestimmt wurde. Beide Male läßt sich keine Neusynthese nachweisen. Auch die zur Kontrolle durchgeführten Versuche an Gerste, Hirse und Weizen zeigten keine Neusynthese. Damit sichergestellt ist, daß die von uns verwendeten Versuchsbedingungen keinen Fehler bedingen, untersuchten wir Neusynthese auch bei Senf. Bei dem Senf (Sorte Steinacher Weiß) ließ sich keine Neusynthese induzieren, dagegen trat bei dem von Herrn MARMÉ zur Verfügung gestellten Senf Neusynthese auf. Diese entsprach den von ihm beschriebenen (MARMÉ, 1969 a) Versuchsergebnissen.

Als Erklärung für die fehlende Neusynthese lassen sich folgende Hypothesen aufstellen:

Das Saatgut könnte bereits zu lange gelagert sein, so daß eine Beobachtung der "normalen" physiologischen Prozesse nicht mehr möglich ist. Auch kann der Zeitpunkt der Untersuchung "falsch" gewählt sein, da eventuell 4 Tage alte Haferkeimlinge bereits zu alt sind, oder aber die Lichtinduktion nicht

in einem für die Rhythmik (JABBEN, SCHÄFER, 1976) günstigen Augenblick erfolgte. Es ist bei allen Untersuchungen zu beachten, daß unterschiedliches Saatgut verschiedene Ergebnisse bewirken kann.

Eine weitere mögliche Erklärung für Anstieg und Schwanken des Phytochromgehaltes ist die rhythmische Oszillation des Phytochroms. Ein rhythmisches Schwanken der Pelletierbarkeit und des Phytochromgehaltes tritt bei Kürbis nach Induktion durch 2 x 12 Stunden Weißlicht (JABBEN, SCHÄFER, 1976) auf. Bei unseren Versuchen sind diese Licht- und Dunkelphasen nicht gegeben (da Dauerweißlicht verwendet wurde) und die von JABBEN und SCHÄFER beobachtete Oszillation ist demnach keine ausreichende Erklärung für Ansteigen und Schwanken des Phytochromgehaltes nach Beginn der Dauerbelichtung mit Weißlicht. Jedoch konnten wir ein Oszillieren des Phytochromgehaltes beobachten bei einigen Versuchen zur Stabilität des Phytochroms *in vitro*. Dies könnte auch *in vivo* auftreten und so Ansteigen und Schwanken des Phytochromgehaltes hervorrufen.

Bei unseren Beobachtungen der Destruktion *in vivo* mit Hilfe der Membranbindungsmethode zeigte sich, daß nicht nur die gebundene, sondern auch - nach einer lag-phase - die lösliche Fraktion einer Destruktion unterliegt. Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit den Untersuchungen von RUBINSTEIN et al. (1969), welche zwar *in vitro* auch eine Abnahme des Phytochromgehaltes in der gebundenen Fraktion, jedoch keine in der löslichen Fraktion zeigen konnten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse, welche in beiden Fällen bei Hafer gefunden wurden, lassen sich damit erklären, daß bei RUBINSTEIN et al. ein Extrakt hergestellt und anschließend *in vitro* die Abnahme des Phytochromgehaltes beobachtet wurde, wogegen bei unseren Versuchen Destruktion *in vivo* (also in den intakten Keimlingen) ablaufen konnte und dann erst zu den untersuchten Zeiten die Keimlinge geerntet und extrahiert wurden.

Bei Mais wurde ein ähnliches Ergebnis wie das von uns beobachtete gefunden (SCHÄFER et al., 1975). Hier beschreiben die

Autoren bei der gebundenen Fraktion eine Destruktion, welche einsetzt mit Beginn der Belichtung. Bei der löslichen Fraktion jedoch beobachten sie zunächst ein Ansteigen des Phytochromgehaltes, und erst im Anschluß daran setzt auch hier eine Destruktion ein. So finden sie als Summe von löslicher und gebundener Fraktion zunächst keine Destruktion (der Phytochromgehalt bleibt konstant) bis zu 30 Minuten (lag-phase), dann jedoch setzt Destruktion ein. Insgesamt ergibt sich also beim Mais ein ähnliches Bild wie bei dem von uns untersuchten Hafer.

Untersuchungen an Kürbis brachten jedoch ein etwas anderes Bild der Destruktion von löslicher und gebundener Fraktion (BOISARD et al., 1974). Auch hier wurde die Destruktion in vivo beobachtet und der Nachweis erbracht, daß die gebundene Phytochromfraktion im Verlauf der Destruktion an Photoreversibilität verliert. Dabei ergab sich der gleiche Destruktionsverlauf, ob die Keimlinge nur 3 Minuten HR erhielten und anschließend dunkel standen oder ob sie dem Dauerhellrotlicht ausgesetzt waren. Ein Unterschied zeigt sich jedoch bei der löslichen Fraktion. Kurzzeitbelichtung mit 3 Minuten HR induzierte keine Destruktion, Dauerrotlicht aber brachte - nach einer lag-phase - eine Destruktion.

Die Ergebnisse lassen sich also zusammenfassen: das gebundene Phytochrom unterliegt sofort einer Destruktion bei Beginn der Belichtung, wogegen das lösliche Phytochrom zunächst nicht angegriffen, später jedoch auch destruiert wird.

PIKE und BRIGGS (1972 b) gelang die teilweise Reinigung und Charakterisierung einer Protease aus Haferkeimlingen, welche in vitro Haferphytochrom abbaut. Aufgrund ihrer Versuche mit Hemmstoffen für diese Protease (1972 a) kamen sie zu dem Ergebnis, daß der proteolytische Angriff wohl nicht die Basis für die in vivo Destruktion sein kann. CUNDIFF und PRATT (1975) jedoch konnten mit Hilfe immunologischer Untersuchungen zeigen, daß die niedermolekulare Form des Phytochroms durch Proteolyse aus der hochmolekularen Form hervorgeht.

Bei der von uns verwendeten schnellen Extraktion des Phytochroms (Membranbindung) können Veränderungen der Molekulargewichte aufgrund von endogenen Proteasen mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden. So war es möglich, ein "sehr großes" Phytochrom ($MG \approx 800\,000$) nachzuweisen, und zwar trat dies bei 8' HR-belichteten und bei 32 h-Weißlicht-belichteten Keimlingen auf. Bei den kurzzeitig belichteten Keimlingen stieg der Phytochromgehalt bereits im Molekulargewichtsbereich von $\approx 800\,000$ an, das Maximum lag bei $520\,000$. Zusätzlich zeigte sich eine kleinere Fraktion im Bereich $MG\,110\,000$. Aus den Keimlingen, die 32 Stunden Weißlicht erhalten haben, ließen sich drei Phytochromfraktionen mit den Molekulargewichten $\approx 800\,000$, $420\,000$ und $47\,000$ nachweisen. Hier tritt nun - im Gegensatz zu den nur 8' HR-belichteten Keimlingen - ein niedermolekulares Phytochrom auf. Dieses ist wahrscheinlich durch Proteolyse entstanden und somit ist zum ersten Mal ein direkter Hinweis dafür erhalten worden, daß die Destruktion in vivo eine Proteolyse zum niedermolekularen Phytochrom beinhaltet.

Das Phytochrom mit dem Molekulargewicht $420\,000$ entspricht wohl dem aus Roggen. Hier wurde ein Phytochrom isoliert mit einem Molekulargewicht von $375\,000$ (RICE, BRIGGS, 1973).

Die Phytochromfraktion mit dem Molekulargewicht $\approx 800\,000$ ließ sich bei den kurzzeit- und bei den dauerbelichteten Keimlingen nachweisen. Das Vorhandensein eines derart "großen" Phytochroms ($\approx 800\,000$) wurde auch von PRATT (1973) erwähnt. Er findet es in geringen Mengen im Ausschlußpeak bei der Gelchromatographie. Inzwischen wurde dieses sehr große Phytochrom erneut bei Hafer nachgewiesen und somit bestätigt (GROMBEIN, RÜDIGER, 1976). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob es sich um ein sehr hoch aggregiertes Phytochrom handelt oder ob bei Belichtung der Keimlinge ein Aggregat aus Phytochrom und anderen Zellbestandteilen (z.B. Bindung an einen Rezeptor) entsteht.

5.) Untersuchungen zur Stabilität von Phytochrom in vitro

5.1.) Einleitung und Ergebnisse

Bei Untersuchungen des Phytochroms in vitro zeigte sich, daß auch hier ein Verlust der Photoreversibilität von Phytochrom zu beobachten ist. Dieser Prozeß ist nicht vergleichbar mit der Destruktion in vivo, da er sowohl bei P_r als auch bei P_{fr} stattfinden kann (SMITH, KENDRICK, 1976). P_{fr} wird bei der Denaturierung von Phytochrom in vitro stärker von proteolytischen Enzymen und SH-Reagenzien angegriffen als P_r (BUTLER et al., 1964). Auch die von LISANSKY et al. (1974) untersuchten Metallwirkungen auf die Stabilität von Phytochrom in vitro beruht auf Denaturierung. Aus Erbsen wurde eine niedermolekulare Substanz isoliert, welche in vitro P_{fr} -Denaturierung bewirkt und auch in Haferextrakten eine Abnahme der Photoreversibilität hervorruft (sog. "killer"; FURUYA, HILLMAN, 1966; FOX, 1975). RUBINSTEIN et al. (1969) konnten aus in vivo belichteten Haferkeimlingen eine membrangebundene Phytochromfraktion und eine lösliche Phytochromfraktion isolieren, wobei in der gebundenen Fraktion Denaturierung von Phytochrom auftrat. Nach etwa 20 Stunden konnten sie in dieser Fraktion nur noch 50% des ursprünglichen Phytochromgehaltes nachweisen, wogegen in der löslichen Fraktion keine Abnahme des Phytochromgehaltes nachzuweisen war.

Wir untersuchten in dieser Arbeit, ob in einer Phytochromlösung, bei welcher kein Verlust der Photoreversibilität auftritt, durch Zugabe eines phytochromfreien Pellets eine Abnahme des Phytochromgehaltes induziert werden kann. Daher überprüften wir zunächst die Stabilität von Phytochromlösungen unterschiedlicher Konzentrationen.

Diese wurden aus 4 Tage alten, etiolierten oder 8' HR belichteten Haferkeimlingen hergestellt, wobei Homogenat die Probe ist, welche nach Zerkleinern und Entfernen der groben Zellbestandteile, Rohextrakt (RE) nach Zentrifugation des Homogenats und angereichertes Phytochrom nach Reinigung des RE an Hydroxylapatit und anschließende Ammoniumsulfatfällung gewonnen wird (siehe Kap. 2.4.1.). Ein weiterer Aspekt dieser Untersuchung war der Einfluß von Na_2SO_3 auf die Stabilität des Phyto-

chroms. Zusätzlich überschichteten wir einen Teil der Proben mit Paraffin, um eine Beeinflussung durch Luftsauerstoff zu verhindern.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Homogenat: ohne Na_2SO_3 : die belichteten Proben zeigen eine geringere Abnahme des Phytochromgehaltes als die unbelichteten, ohne Paraffin ist dieser Effekt stärker;
0,01 M Na_2SO_3 : hier ist eine Unterscheidung zwischen etiolierten/belichteten bzw. mit/ohne Paraffin fast nicht möglich, da so gut wie keine Abnahme des Phytochromgehaltes nachweisbar ist.

RE: ohne Na_2SO_3 : bei den Proben ohne Paraffin zeigt sich eine starke Abnahme des Phytochromgehaltes in der etiolierten Probe, dies ist in der belichteten Probe nicht so ausgeprägt; mit Paraffin ist in beiden Fällen eine Abnahme des Phytochromgehaltes vorhanden, jedoch lassen sich etiolierte und belichtete Probe nicht unterscheiden.
0,01 M Na_2SO_3 : die belichtete Probe weist eine leichte Abnahme des Phytochromgehaltes auf im Gegensatz zur unbelichteten, bei welcher der Phytochromgehalt konstant blieb; diese Proben waren ohne Paraffin.

angereichertes Phytochrom: 0,01 M Na_2SO_3 : die Proben ohne Paraffin weisen eine deutliche Abnahme des Phytochromgehaltes auf, bei den Proben mit Paraffin ist diese jedoch nicht so ausgeprägt; etiolierte und belichtete Proben verhalten sich ähnlich.
0,1 M Na_2SO_3 : es wurden nur etiolierte Proben mit und ohne Paraffin untersucht und der Phytochromgehalt blieb in dem untersuchten Zeitraum fast konstant.

Tabelle 6: Stabilität von Phytochrom in vitro: Abhängigkeit des Phytochromgehaltes von der im Puffer enthaltenen Na_2SO_3 -Konzentration, Belichtungsart der Keimlinge (etioliert oder HR) und Einfluß des Luftsauerstoffes; die Werte geben an, wieviel vom ursprünglichen Phytochromgehalt (=100%) nach 6 Stunden noch vorhanden ist; die Proben wurden dunkel und bei Raumtemperatur (23°C) aufbewahrt.

	Konzentration an Na_2SO_3	ohne Paraffin		mit Paraffin	
		etioliert	HR	etioliert	HR
Homogenat	— 0,01 M	61,7% 94,9%	92,3% 103,0%	84,8% 102,0%	104,0% 95,8%
RE	— 0,01 M	19,7% 100,0%	52,4% 83,4%	62,5%	65,6%
angereichertes Phytochrom	0,01 M 0,1 M	28,2% 96,0%	21,1%	70,7% 107,0%	70,9%

In dem folgenden Versuch wurde zu einer angereicherten Phytochromlösung der phytochromfreie Niederschlag der Homogenatzentrifugation (bei welcher der Rohextrakt gewonnen wird) zugegeben, die Proben zum Teil mit Paraffin überschichtet und über einen längeren Zeitraum der Gehalt an Phytochrom bestimmt. Die zur Herstellung des phytochromfreien Pellets verwendeten 4 Tage alten Keimlinge waren etioliert oder hatten 2 Stunden Dauerweißlicht von 2000 Lux erhalten.

Tabelle 7: Stabilität von Phytochrom in vitro: Einfluß eines phytochromfreien Pellets auf die Stabilität einer angereicherten Phytochromlösung; Erläuterungen siehe Tabelle 6.

Konzentration an Na_2SO_3	0,01 M	0,1 M
ohne Paraffin etioliert		97,3%
mit Paraffin HR etioliert	40,6% 63,9%	105,0%

Bei einer geringen Na_2SO_3 -Konzentration (0,01 M) ist bei der belichteten Probe eine deutliche Abnahme des Phytochromgehaltes vorhanden, welche bei der etiolierten Probe zwar auch auftritt, jedoch nicht so ausgeprägt ist. Beide Proben waren mit Paraffin überschichtet. Ein hoher Na_2SO_3 -Gehalt beeinflusst auch hier die Stabilität der Phytochromlösung derart, daß nach 6 Stunden der Phytochromgehalt in der Lösung noch konstant ist. Dieses waren etiolierte Proben, welche ohne und mit Zusatz von Paraffin untersucht wurden.

In der folgenden Abbildung (18) wurden die Ergebnisse der Untersuchungen von angereicherten Phytochromlösungen und von diesen mit Pellet-Zusatz zusammengefaßt.

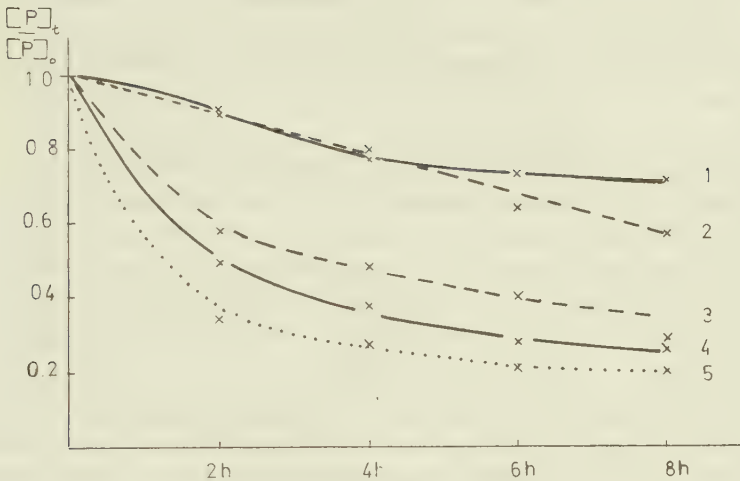


Abb. 18: Stabilität von Phytochrom in vitro: Untersuchung des unterschiedlichen Verhaltens etiolierter und belichteter Proben und aerober/anaerober Bedingungen; die angegebenen Werte sind bezogen auf den Gehalt an Phytochrom zum Zeitpunkt $t = 0$; jeweils $0,01 \text{ M Na}_2\text{SO}_3$
Gruppe I:

- 1) angereichertes Phytochrom mit Paraffin (etioliert und belichtet gleich)
- 2) Pellet aus etiolierten Keimlingen mit angereichertem Phytochrom, mit Paraffin

Gruppe II:

- 3) Pellet aus belichteten Keimlingen mit angereichertem Phytochrom, mit Paraffin
- 4) angereichertes Phytochrom etioliert ohne Paraffin
- 5) angereichertes Phytochrom belichtet ohne Paraffin

Es lassen sich zwei Gruppen unterscheiden:

Gruppe I: Die Probe "Pellet aus etiolierten Keimlingen plus angereichertes Phytochrom" zeigt eine geringe Abnahme des

Phytochromgehaltes, welche fast gleich ist mit der mit Paraffin überschichteten angereicherten Phytochromlösung (Kurven 1 und 2). Hier läßt sich der Einfluß des Luftsauerstoffs ausschließen (da die Proben mit Paraffin überschichtet waren), und es zeigt sich nur eine "endogen" bedingte Abnahme des Phytochromgehaltes.

Bei Gruppe II (Kurven 3, 4 und 5) zeigt sich nicht nur diese kontinuierliche Abnahme, sondern es treten zwei Geschwindigkeiten auf. Anfangs ist die Abnahme sehr schnell, dann gleicht sie sich der von Gruppe I an. Dieser schnelle Phytochromverlust läßt sich bei den Kurven 4 und 5 durch den Einfluß von Luftsauerstoff erklären, da aerob (ohne Paraffin) gearbeitet wurde.

Obwohl die Probe "Pellet aus belichteten Keimlingen plus angereichertes Phytochrom" (Kurve 3) mit Paraffin überschichtet war, entspricht der Verlauf der Kinetik dem der unter aeroben Bedingungen durchgeführten Kinetiken.

Dies ist auf den Einfluß des Pellets zurückzuführen, welches hier unter anaeroben Bedingungen eine dem Luftsauerstoff ähnliche Wirkung hervorruft.

Destruktion in vivo und Denaturierung in vitro, welche beide durch die Abnahme an $\Delta(\Delta E)$ nachweisbar sind, unterscheiden sich dadurch, daß in vivo eine lag-phase von mindestens 1 Stunde (siehe Kapitel 3.2.2.) auftritt, wogegen in vitro die Abnahme der Photoreversibilität sofort einsetzt. Offensichtlich benötigt die bei der Destruktion in vivo beobachtete lag-phase intakte Zellen.

Die Untersuchung der Stabilität von Phytochromlösungen ergab bei den Proben des Rohextraktes ein unerwartetes Verhalten.

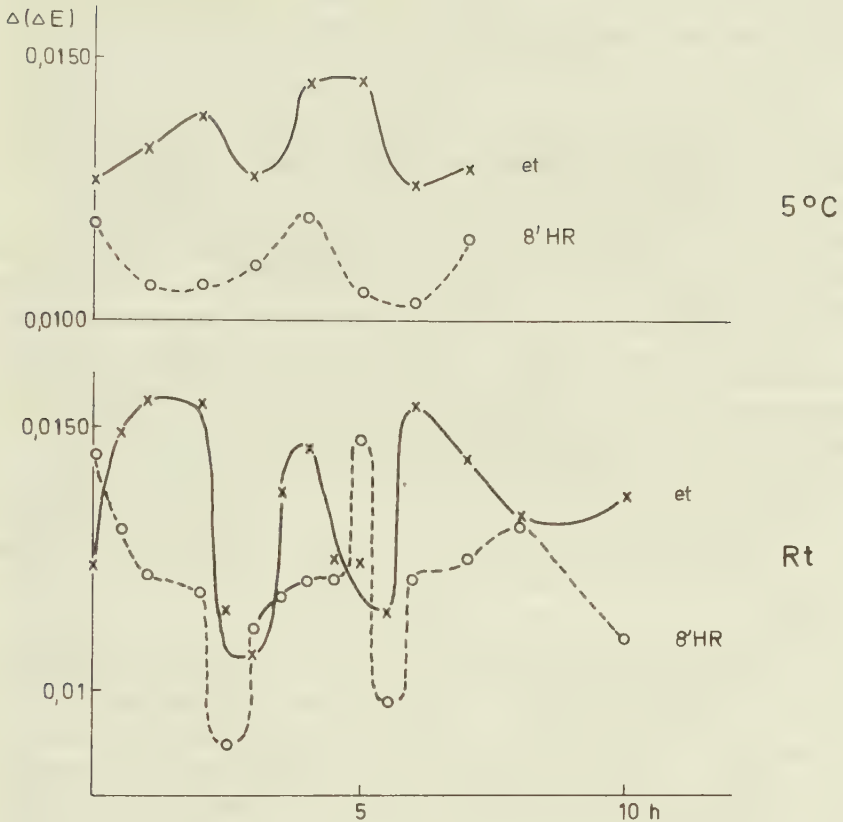


Abb. 19: Stabilität von Phytochrom in vitro: in Rohextrakten aus 4 Tage alten, etiolierten oder 8' HR belichteten Haferkeimlingen wurde bis zu 10 Stunden der Phytochromgehalt bestimmt; der Na_2SO_3 -Gehalt betrug 0,01 M; die Proben wurden jeweils im Dunkeln bei 5°C oder bei Raumtemperatur (23°C) aufgehoben; dargestellt ist ein Beispiel aus 8 Versuchen.

Bei den bei 5°C aufgehobenen Proben läßt sich in dem untersuchten Zeitraum ($\rightarrow 7$ h) keine Abnahme des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes nachweisen. Der zu verschiedenen Zeiten bestimmte Phytochrom-

gehalt weist große Unterschiede auf. Dabei ergibt sich das Bild einer Oszillation und etioliierte und belichtete Probe befinden sich zu Beginn in entgegengesetzter Phase.

Auch die bei Raumtemperatur aufbewahrten Rohextrakte zeigen bis zu 10 Stunden keine Abnahme des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes und ebenso wie die bei 5°C aufbewahrten Proben ein Oszillieren des Meßwertes. Hier ist die Oszillation schneller als bei 5°C; etioliierte und belichtete Probe befinden sich wieder in entgegengesetzter Phase.

Tabelle 8: Maxima und Minima ($\Delta(\Delta E) \cdot 10^{-4}$) der Oszillation des bei Raumtemperatur aufbewahrten Rohextraktes: zugrunde gelegt wurde eine Streuung der Meßwerte von 5%, bedingt durch das Meßgerät; dargestellt ist ein Beispiel aus 8 Versuchen.

Zeit (h)	etioliiert		Zeit (h)	8' HR	
	$\Delta(\Delta E)$	Streuung		$\Delta(\Delta E)$	Streuung
0	124	130 118	0	145	152 138
1,5	155	163 147	2,5	90	95 85
3	107	112 102	5	148	155 141
4	146	153 139	5,5	98	103 93

Der Streubereich eines Meßwertes mit geringem $\Delta(\Delta E)$ -Wert liegt weit genug entfernt von dem eines Meßwertes mit hohem $\Delta(\Delta E)$ -Wert, so daß eine eindeutige Unterscheidung möglich ist. Eine Erklärung für diese Oszillation konnte bisher nicht gefunden werden.

5.2.) Diskussion

Im Verlauf unserer Untersuchungen in vitro konnte ein deutlicher Einfluß des Na_2SO_3 auf die Stabilität unterschiedlich konzentrierter Phytochromlösungen gezeigt werden. Ohne Na_2SO_3 nahm bei Homogenat und Rohextrakt der Phytochromgehalt ab. Der Zusatz von 0,01 M Na_2SO_3 vermochte in diesen Proben eine Abnahme des Phytochromgehaltes zu verhindern. Die bei einer Na_2SO_3 -Konzentration von 0,01 M beobachtete Abnahme des Phytochromgehaltes bei angereicherten Phytochromlösungen ließ sich aber fast vollständig aufheben durch Erhöhung der Na_2SO_3 -Konzentration auf 0,1 M.

Es zeigt sich also, daß eine direkte Beziehung besteht zwischen der Abnahme des Phytochromgehaltes, der Phytochrom-Konzentration und dem Natriumstlfitgehalt: Um eine vollständige Hemmung der Abnahme zu erhalten, muß bei einer höheren Phytochrom-Konzentration auch ein höherer Gehalt an Na_2SO_3 vorliegen.

Homogenat und Rohextrakt zeigen bei den Proben ohne Na_2SO_3 eine Abnahme der Photoreversibilität, welche im Rohextrakt schneller verläuft als im Homogenat. Möglicherweise ist im Homogenat ein Schutzfaktor vorhanden, der Phytochrom stabilisiert. LISANSKY und GALSTON (1976) beschreiben einen niedermolekularen Schutzfaktor, den sie aus grünem Erbsengewebe isolieren konnten.

Ein Schutzfaktor sollte in angereicherten Phytochromlösungen nicht mehr enthalten sein. Daher verwendeten wir diese zur Untersuchung der Wirkung des Pellets auf die Photoreversibilität von Phytochrom in vitro.

Angereicherte Phytochromlösungen zeigen den Einfluß des Luft-sauerstoffs: in den aeroben Proben nimmt der Phytochromgehalt zunächst sehr schnell, nach 2 Stunden deutlich langsamer ab, wogegen bei den anaerob aufbewahrten Proben nur eine gleichmäßige geringe Abnahme zu beobachten ist. Dabei verhalten sich belichtete und etiolierte Proben fast gleich (Kurve 4 und 5).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Pellet-Proben, wenn das Pellet aus belichteten Keimlingen gewonnen wurde (Kurve 3). Obwohl die Proben mit Paraffin überschichtet waren - also anaerob - wurde hier bis zu 2 Stunden eine schnelle, anschließend eine langsame Abnahme des Phytochromgehaltes beobachtet, jedoch nur so viel wie die Probe "aerob ohne Pellet". Diese Effekte sind nur bei einem geringen Na_2SO_3 -Gehalt (0,01 M) zu sehen. Bei einem hohen Gehalt an Na_2SO_3 (0,1 M) läßt sich keine Abnahme des Phytochromgehaltes mehr nachweisen (Tabelle 7).

Die unter anaeroben Bedingungen beobachtete Abnahme der Photo-reversibilität (Kurve 1) beruht auf Denaturierung des Phytochroms (SMITH, KENDRICK, 1976), da das Phytochrom in der P_{fr} - und in der P_r -Form eine gleich schnelle Abnahme aufweist (siehe Tabelle 6, angereicherte Phytochromlösung).

Bei der Gegenüberstellung der Halbwertszeit ($t_{1/2} \approx 70'$) der Destruktion in vivo nach Beendigung der lag-phase und der Halbwertszeit ($t_{1/2} \approx 11 \text{ h}$) der Phytochromabnahme in vitro unter anaeroben Bedingungen wird deutlich, daß bei Destruktion in vivo und Denaturierung in vitro verschiedene Prozesse zugrunde liegen.

Unter aeroben Bedingungen tritt innerhalb der ersten 2 Stunden eine schnelle Abnahme ($t_{1/2} \approx 110'$) des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes auf (Gruppe II). Die hier ermittelte Halbwertszeit ist mit der in vitro beobachteten Destruktionsrate vergleichbar. Aufgrund dieser Raten für die Abnahme des Phytochromgehaltes könnte man auf ähnliche Reaktionen schließen. Aus der Differenz der Kinetiken der Gruppen I und II wird ersichtlich, daß diese "in vitro Destruktion" nur zu Beginn auftritt, da später die Differenz fast konstant bleibt und somit die unter anaeroben Bedingungen vorliegende Denaturierung jetzt auch unter aeroben Bedingungen stattfindet.

Der Einfluß des Pellets auf die Abnahme der Photoreversibilität wird deutlich bei der Probe, bei welcher das Pellet aus belichteten Keimlingen gewonnen wurde. Unter anaeroben Bedingungen tritt hier eine Abnahme des Phytochromgehaltes auf,

welche den aeroben Bedingungen ohne Pellet entspricht. Dieser Effekt des Pellets beruht möglicherweise darauf, daß durch die Belichtung in vivo in den pelletierbaren Bestandteilen der Zelle Oxidationsäquivalente aufgebaut wurden.

Die im Rohextrakt beobachtete Oszillation des Phytochromgehaltes wurde nicht in angereicherten Phytochromlösungen beobachtet. Sie könnte möglicherweise in den untersuchten Rohextrakten auf Bindung und Loslösen oder Aggregieren des Phytochroms mit nichtpelletierbaren Bestandteilen der Zellen beruhen, welche aufgrund der Reinigungsschritte in den angereicherten Phytochromlösungen nicht mehr vorhanden sind. Diese sich ständig ändernde Photoreversibilität könnte der Grund dafür sein, warum bei unseren Untersuchungen zur Destruktion in vivo bei Beginn der Dauerweißlichtbelichtung ein Ansteigen des Phytochromgehaltes zu beobachten ist.

6.) Zusammenfassung der Ergebnisse

- 1) Mit Hilfe des selbstgebauten Photometers ist es möglich, den Phytochromgehalt einer Probe schnell zu bestimmen, da das Gerät jeweils ΔE -Werte der P_r - oder P_{fr} -Form angibt und somit ein Ablesen der einzelnen Extinktionen entfällt.
- 2) Auch können nun trübe Lösungen und Keimlinge direkt gemessen werden. Dies war bei dem zuvor verwendeten DMR 22 nicht möglich, da der Photomultiplier von der Küvette weit entfernt ist.
- 3) Ein Vergleich der Meßwerte zwischen DMR 22 und dem selbstgebauten Photometer ist ohne weiteres möglich.
- 4) Untersucht wurde die Destruktion in vivo, und im Gegensatz zu den Untersuchungen von KIDD und PRATT (1973) konnten nicht nur bei 3 Tage alten Keimlingen, sondern auch bei 4 und 5 Tage alten Keimlingen eine lag-phase zu Beginn der Destruktion in vivo nachgewiesen werden. Die Dauer der lag-phase nimmt bei zunehmendem Alter der Keimlinge zu.
- 5) Dies läßt sich nicht in Beziehung setzen mit einer altersabhängigen Änderung der Stoffwechselaktivität. Zwar ist die Atmungsrate der 3, 4 und 5 Tage alten Keimlinge unterschiedlich, jedoch zeigt sich - abhängig von der gewählten Bezugsgröße - jeweils ein anderes Bild: setzt man 1,0 g Frischgewicht als Bezugsgröße, so nimmt die Atmungsrate in der Reihenfolge $3 > 4 > 5$ Tage ab; wählt man 1 Keimling als Bezugsgröße, so nimmt sie in der Reihenfolge $3 < 4 < 5$ Tage zu.
- 6) Es konnte ein Einfluß der Lichtintensität auf die Destruktion in vivo während der lag-phase nachgewiesen werden. Außerdem ergab sich auch hier eine Beziehung zum Alter der verwendeten Keimlinge. In 3 Tage alten Keimlingen wird hauptsächlich eine Abnahme hervorgerufen, wogegen in 5 Tage alten Keimlingen ein Ansteigen des Phytochromgehaltes zu beobachten ist.

- 7) Dieser Anstieg läßt sich nicht auf eine Änderung des Keimlingsfrischgewichtes in dem untersuchten Zeitraum zurückführen.
- 8) Eine Neusynthese des Phytochroms konnte bei Hafer, Gerste, Hirse und Weizen nicht nachgewiesen werden. Auch ein hier in München gekaufter Senf zeigte keine Neusynthese, wogegen ein von Herrn MARMÉ, Freiburg, zur Verfügung gestellter Senf Neusynthese aufwies.
- 9) Bei der Untersuchung der Destruktion in vivo mit Hilfe der Membranbindungsmethode zeigte sich, daß nicht nur der gebundene Phytochromanteil, sondern auch der lösliche Anteil nach einer lag-phase der Destruktion in vivo unterliegt.
- 10) Die Molekulargewichtsbestimmung von membrangebundenem Phytochrom vor und nach Destruktion ergab, daß ohne Destruktion (Keimlinge nur 8' HR belichtet und anschließend sofort extrahiert) Molekulargewichte von 800 000, 520 000 und 110 000 auftraten, wogegen nach Destruktion (Keimlinge 32 h Weißlicht belichtet) Molekulargewichte von 800 000, 420 000 und 47 000 nachgewiesen werden konnten. Phytochrom mit dem Molekulargewicht 47 000 wurde bei den nur 8' HR belichteten Keimlingen nicht beobachtet und ist wahrscheinlich durch Proteolyse entstanden. Damit ist zum ersten Mal ein direkter Hinweis dafür erhalten worden, daß Destruktion in vivo Proteolyse beinhaltet.
- 11) Es konnte der Einfluß von Na_2SO_3 auf die Stabilität des Phytochroms in vitro nachgewiesen werden, und zwar ist zur Stabilisierung von Phytochrom in höheren Konzentrationen auch ein höherer Gehalt an Na_2SO_3 erforderlich.
- 12) Der Einfluß eines phytochromfreien Pellets auf den Gehalt einer angereicherten Phytochromlösung konnte gezeigt werden. Ein Pellet aus belichteten Keimlingen induzierte unter anaeroben Bedingungen eine Abnahme des Phytochromge-

haltes, welche der unter aeroben Bedingungen ohne Pellet vergleichbar ist.

- 13) Die Bestimmung des Phytochromgehaltes in Rohextrakten aus etiolierten oder belichteten Keimlingen zu verschiedenen Zeiten und über einen längeren Zeitraum zeigte eine starke Oszillation des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes, jedoch bis zu 7 Stunden keine Abnahme des Phytochromgehaltes.

7.) Literaturverzeichnis

- BOISARD, J., D. MARMÉ and W.R. BRIGGS: In vivo properties of membrane-bound Phytochrome. *Plant Physiol.* 54, 272 (1974)
- BORTHWICK, H.A., S.B. HENDRICKS, M.W. PARKER, E.H. TOOLE and V.K. TOOLE: A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 38, 662 (1952)
- BORTHWICK, H.A., S.B. HENDRICKS, E.H. TOOLE and V.K. TOOLE: Action of light on lettuce-seed germination. *Bot. Gaz.* 115, 205 (1954)
- BORTHWICK, H.A. and S.B. HENDRICKS: Photoperiodism in plants. *Science* 132, 1223 (1960)
- BRAUNER, C. and W. RAU: Versuche zur Bewegungsphysiologie der Pflanzen. S. 134, Springer-Verlag, Berlin (1966)
- BRIGGS, W.R. and H.W. SIEGELMAN: Distribution of Phytochrome in etiolated seedlings. *Plant Physiol.* 40, 934 (1965)
- BRITZ, S.J., J.M. MACKENZIE jr. and W.R. BRIGGS: Non-homogeneous pigment distribution multiple all layers, and the determination of Phytochrome by in vivo spectrophotometry. *Photochem. Photobiol.* 25, 137 (1977)
- BUTLER, W.L.: Absorption of light by turbid materials. *J. Opt. Soc. Am.* 52, 292 (1962)
- BUTLER, W.L., S.B. HENDRICKS and H.W. SIEGELMAN: Action spectra of Phytochrome in vitro. *Photochem. Photobiol.* 3, 521 (1964)
- BUTLER, W.L. and H.C. LANE: Dark transformations of Phytochrome in vivo. II. *Plant Physiol.* 40, 13 (1965)
- BUTLER, W.L., H.C. LANE and H.W. SIEGELMAN: Nonphotochemical transformations of Phytochrome in vivo. *Plant Physiol.* 38, 514 (1963)
- BUTLER, W.L. and K.H. NORRIS: The spectrophotometry of dense light-scattering material. *Arch. Biochem. Biophys.* 87, 31 (1960)
- BUTLER, W.L., K.H. NORRIS, H.W. SIEGELMAN and S.B. HENDRICKS: Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 45, 1703 (1959)
- BUTLER, W.L., H.W. SIEGELMAN and C.O. MILLER: Denaturation of Phytochrome. *Biochemistry* 3, 851 (1964)

- CHORNEY, W. and S.A. GORDON: Action spectrum and characteristics of the light activated disappearance of Phytochrome in oat seedlings. *Plant Physiol.* 41, 891 (1966)
- CLARKSON, D.T. and W.S. HILLMAN: Apparent Phytochrome synthesis in *Pisum* tissue. *Nature* 213, 468 (1967 a)
- CLARKSON, D.T. and W.S. HILLMAN: Modification of apparent Phytochrome synthesis in *Pisum* by inhibitors and growth regulators. *Plant Physiol.* 42, 933 (1967 b)
- CLARKSON, D.T. and W.S. HILLMAN: Stable concentrations of Phytochrome in *Pisum* under continuous illumination with red light. *Plant Physiol.* 43, 88 (1968)
- COLEMAN, R.A. and L. PRATT: Phytochrome: immunocytochemical assay of synthesis and destruction. *Planta* 119, 221 (1974 a)
- COLEMAN, R.A. and L. PRATT: Subcellular localization of the red-absorbing form of Phytochrome by immunocytochemistry. *Planta* 121, 119 (1974 b)
- CORRELL, D.L. and W. SHROPSHIRE jr.: Phytochrome in etiolated annual rye: I. Changes during growth in the amount of photoreversible Phytochrome in the coleoptile and primary leaf. *Planta* 79, 275 (1968)
- CUNDIFF, S.C. and L. PRATT: Immunological and physical characterization of the products of Phytochrome proteolysis. *Plant Physiol.* 55, 212 (1975)
- DELINT, P.J.A.L. and C.J.P. SPRUIT: Phytochrome destruction following illumination of mesocotyls of *Zea mays*. *Meded. Landbouwh., Wageningen* 63, 1 (1963)
- DOOSKIN, R.H. and A.L. MANCINELLI: Phytochrome decay and coleoptile elongation in *Avena* following various light treatments. *Bulletin of the Torrey Bot. Club* 95, 474 (1968)
- DUKE, S.O., NAYLOR and J.L. WICKLIFF: Phytochrome control of longitudinal growth and Phytochrome synthesis in maize seedlings. *Physiol. Plant.* 40, 59 (1977)
- FOX, L.R.: Loss of Phytochrome-photoreversibility in vitro; I. Extraction and partial purification of killer. *Plant Physiol.* 55, 386 (1975)
- FURUYA, M. and W.S. HILLMAN: Observations on spectrophotometrically assayable Phytochrome in vivo in etiolated *Pisum* seedlings. *Planta* 63, 31 (1964)

- FURUYA, M. and W.S. HILLMAN: Rapid destruction of the P_{fr} form of Phytochrome by a substance in extracts of Pisum tissue. Plant Physiol. 41, 1242 (1966)
- FURUYA, M., W.G. HOPKINS and W.S. HILLMAN: Effects of metal-complexing and sulfhydryl compounds on non-photochemical Phytochrome changes in vivo. Arch. Biochem. Biophys. 112, 180 (1965)
- GARDNER, G., C.S. PIKE, H.V. RICE and W.R. BRIGGS: "Disaggregation" of Phytochrome in vitro: A consequence of proteolysis. Plant Physiol. 48, 686 (1971)
- GRILL, R.: The influence of Chlorophyll on in vivo difference spectra of Phytochrome. Planta 108, 185 (1972)
- GRILL, R.: Influence of Chlorophyll content on Phytochrome measurements in turnip cotyledons. Planta 134, 11 (1977)
- GROMBEIN, S.: Dissertation, Universität München, 1976
- GROMBEIN, S. and W. RÜDIGER: On the molecular weight of Phytochrome: A new high molecular Phytochrome species in oat seedlings. Hoppe Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 357, 1015 (1976)
- GROMBEIN, S., W. RÜDIGER, L. PRATT and D. MARMÉ: Phytochrome pelletability in extracts of Avena shoots. Plant Sci. Letters 5, 275 (1975)
- HENDRICKS, S.B., H.A. BORTHWICK and R.J. DOWNS: Pigment conversion in the formative responses of plants to radiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 42, 19 (1956)
- JABBen, M. and E. SCHÄFER: Rhythmic oscillations of Phytochrome and its pelletability in Cucurbita pepo L. Nature 259, 114 (1976)
- JOSE, A.M., D. VINCE-PRUE and J. HILTON: Chlorophyll interference with Phytochrome measurement. Planta 135, 119 (1977)
- KENDRICK, R.E.: Aspects of Phytochrome decay in etiolated seedlings under continuous illumination. Planta 102, 286 (1972)
- KENDRICK, R.E. and B. FRANKLAND: Kinetics of Phytochrome decay in Amaranthus seedlings. Planta 82, 317 (1968)
- KENDRICK, R.E. and B. FRANKLAND: The in vivo properties of Amaranthus Phytochrome. Planta 86, 21 (1969)
- KENDRICK, R.E. and W.S. HILLMAN: Absence of Phytochrome dark reversion in seedlings of the Centrospermal. Amer. J. Bot. 58, 424 (1971)

- KIDD, G.H. and L. PRATT: An apparent requirement for protein synthesis in the induction of the destruction mechanism. *Plant Physiol.* 52, 309 (1973)
- LANE, H.C., H.W. SIEGELMAN, W.L. BUTLER and E.M. FIRER: Detection of Phytochrome in green plants. *Plant Physiol.* 38, 414 (1963)
- LANGE, H., W. SHROPSHIRE jr. and H. MOHR: An analysis of Phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Physiol.* 47, 649 (1971)
- LISANSKY, S.G. and A.W. GALSTON: Phytochrome stability in vitro: I. Effect of metal ions. *Plant Physiol.* 53, 352 (1974)
- LISANSKY, S.G. and A.W. GALSTON: Phytochrome stability in vitro: II. A low molecular weight protective factor. *Plant Physiol.* 57, 188 (1976)
- MACKENZIE jr., J.M., R.A. COLEMAN, W.R. BRIGGS and L. PRATT: Reversible redistribution of Phytochrome within the cell upon conversion to its physiologically active form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72, 799 (1975)
- MARMÉ, D.: Photometrische Messungen am Phytochromsystem von Senfkeimlingen (*Sinapis alba*). *Planta* 88, 43 (1969 a)
- MARMÉ, D.: An automatic recording device of measuring Phytochrome with a dual wavelength ratiospect. *Planta* 88, 58 (1969 b)
- MARMÉ, D., J.M. MACKENZIE jr., J. BOISARD and W.R. BRIGGS: The isolation and partial characterization of membrane fraction containing Phytochrome. *Plant Physiol.* 54, 263 (1974)
- MARMÉ, D., B. MARCHAL and E. SCHÄFER: A detailed analysis of Phytochrome decay and dark reversion in mustard cotyledons. *Planta* 100, 331 (1971)
- McATHUR, J.A. and W.R. BRIGGS: In vivo Phytochrome reversion in immature tissue of the Alaska pea seedling. *Plant Physiol.* 48, 46 (1971)
- MOHR, H.: Untersuchungen zur phytochrominduzierten Photomorphogenese des Keimlings. *Z. Pflanzenphysiol.* 54, 63 (1966)
- MUMFORD, F.E.: Studies on the Phytochrome dark reaction in vitro. *Biochemistry* 5, 522 (1966)

- PIKE, C. and W.R. BRIGGS: The dark reactions of rye Phytochrome in vivo and in vitro. *Plant Physiol.* 49, 514 (1972 a)
- PIKE, C. and W.R. BRIGGS: Partial purification and characterization of a Phytochrome degrading neutral protease from etiolated oat shoots. *Plant Physiol.* 49, 521 (1972 b)
- PRATT, L.: Comparative immunochemistry of Phytochrome. *Plant Physiol.* 51, 203 (1973)
- PRATT, L. and W.R. BRIGGS: Photochemical and nonphotochemical reactions of Phytochrome in vivo. *Plant Physiol.* 41, 467 (1966)
- PRATT, L., G.H. KIDD and R.A. COLEMAN: An immunochemical characterization of the Phytochrome destruction reaction. *Biochem. Biophys. Acta* 365, 93 (1974)
- PRATT, L. and D. MARMÉ: Red light enhanced Phytochrome pelletability, reexamination and further characterization. *Plant Physiol.* 58, 686 (1976)
- QUAIL, P.H., E. SCHÄFER and D. MARMÉ: De Novo synthesis of Phytochrome in pumpkin hooks. *Plant Physiol.* 52, 124 (1973 a)
- QUAIL, P.H., E. SCHÄFER and D. MARMÉ: Turnover of Phytochrome in pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.* 52, 128 (1973 b)
- RICE, H.V. and W.R. BRIGGS: Partial characterization of oat and rye Phytochrome. *Plant Physiol.* 51, 927 (1973)
- RUBINSTEIN, B., K.S. DRURY and R.B. PARK: Evidence for bound Phytochrome in oat seedlings. *Plant Physiol.* 44, 105 (1969)
- RÜDIGER, W.: Isolation and purification of Phytochrome. in: MITRAKOS, K. and W. SHROPSHIRE (Ed.): *Phytochrome*. Acad. Press, London, 1972
- SCHÄFER, E., T.-U. LASSIG and P. SCHOPFER: Photocontrol of Phytochrome destruction in grass seedlings. The influence of wavelength and irradiance. *Photochem. Photobiol.* 22, 193 (1975)
- SCHOCH, S., U. LEMPert and W. RÜDIGER: Über die letzten Stufen der Chlorophyll-Biosynthese, Zwischenprodukte zwischen Chlorophyllid und phytolhaltigem Chlorophyll. *Zeitschr. f. Pflanzenphysiol.* 83, 427 (1977)
- SEPHADEX Gelfiltration in Theorie und Praxis, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- SIEGELMAN, H.W. and W.L. BUTLER: Properties of Phytochrome. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 16, 383 (1965)

- SIEGELMAN, H.W. and E.M. FIRER: Purification of Phytochrome from oat seedlings. *Biochemistry* 3, 418 (1964)
- SMITH, H. and T.H. ATTRIDGE: Increased phenylalanine ammonia-lyase activity due to light treatment and its significance for the mode of action of Phytochrome. *Phytochemistry* 9, 487 (1970)
- SMITH, H. and R.E. KENDRICK: The structure and properties of Phytochrome. in: T.W. GOODWIN, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. 1, Chapter 7, Academic Press, London, 1976
- SPRUIT, C.J.P.: Estimation of Phytochrome by spectrophotometry in vivo: Instrumentation and interpretation. in: MITRAKOS, K. and W. SHROPSHIRE (Ed.): *Phytochrome*. Acad. Press, London, 1972
- STEFFENS, D., I. BLOS, S. SCHOCH und W. RÜDIGER: Lichtabhängigkeit der Phytolakkumulation. *Planta* 130, 151 (1976)
- TANADA, T.: Radiation-induced appearance of Phytochrome in soybean cell suspensions. *Planta* 134, 57 (1977)
- WETHERELL, D.F.: Phytochrome in cultured wild carrot tissue. I. Synthesis. *Plant Physiol.* 44, 1734 (1969)
- ZIEGLER, R. and K. EGLE: Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. *Beitr. Biol. Pflanzen* 41, 11 (1965)

Lebenslauf

26.12.1947	Geburt in Dortmund
April 1954	Einschulung in Dortmund
1955	Übertritt in die Volksschule in Bochum
April 1958	Übertritt in das neusprachliche Schiller-Gymnasium, Bochum
November 1958	Übertritt in das Goethe-Gymnasium, Dortmund, Fachrichtung: mathematisch-naturwissenschaft- licher Zweig
Juli 1967	Abitur am gleichen Gymnasium
September 1967	Beginn der Praktikanten-Zeit in der Rats-Apotheke, Dortmund
September 1969	Vorexamen in Arnsberg
April 1970	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Mai 1973	Staatsexamen an der gleichen Universität
Juni 1973	Approbation als Apothekerin
Januar 1974	Beginn der Dissertation am Botanischen In- stitut der Universität München (Lehrstuhl Phytochemie) unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger

